



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE
GRANOS EN UNA POBLACIÓN DE RILS EN MAÍZ**

Ing. Agr. Agustina Amelong

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. Lucas Borrás

CO-DIRECTOR: Dra. Brenda L. Gambín

2015

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE GRANOS EN UNA POBLACIÓN DE RILS EN MAÍZ

Agustina Amelong

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Rosario

Esta Tesis está presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Manejo de Cultivos Extensivos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2010 y 14 de agosto de 2015, bajo la dirección del Dr. Lucas Borrás.

Ing. Agr. Agustina Amelong

Doctorando

Dr. Lucas Borrás

Director

Dra. Brenda L. Gambín

Co-director

Defendida: 14 de agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Lucas Borrás por darme la oportunidad de hacer este trabajo de tesis. Su guía y dedicación hicieron que esta tesis fuera posible. A Brenda Gambín por la ayuda en las distintas etapas de la tesis.

A Santiago Alvarez Prado, el mejor *coequiper* y su ayuda incondicional. A los investigadores y becarios del GIMUCE, por su amistad, compañía y estímulo.

A Mike Lee por proveer la población de RILs. Daniel Novoa, Nidera S.A. y Víctor Abertondo por su colaboración para incrementar las semillas de la población.

Al personal de la facultad que facilitó nuestro trabajo en el campo y a distintos docentes de la facultad que me ayudaron con consultas específicas de su tema.

A CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por su financiación a través de una beca para llevar a cabo esta tesis doctoral. A la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias.

A los evaluadores de este trabajo de tesis: Gustavo Rodríguez, Guillermo Eyhérbide y Karina D'Andrea.

A Gerónimo por aguantarme durante todo este tiempo y a mis hijos Pablo y Tomás por poner mi vida patas para arriba de una forma maravillosa.

A mis viejos por su apoyo y esfuerzo para que pueda formarme. A mi hermana por su ayuda y compañía.

DEDICATORIA

A mi Tía Nina.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS
 - **Amelong, A.**, Gambín B.L., Severini A.D., Borrás, L. 2015. Predicting maize kernel number using QTL information. Field Crops Research 172, 119-131.

- PUBLICACIONES EN CONGRESOS
 - **Amelong, A.**; Gambín, B.L.; Borrás, L., 2012. QTLs asociados a procesos fisiológicos relacionados con la determinación de número de granos en maíz. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, Buenos Aires, 17-22 Septiembre 2012. Pág. 243.
 - **Amelong, A.**; Borrás, L.; Gambín, B.L. 2010. Caracterización fenotípica para crecimiento y número de granos en una población de RILs (B73 x Mo17) de maíz. IX Congreso Nacional de Maíz. Rosario 17-19 de Noviembre. Pág. 307-309.
 - **Amelong, A.**; Borrás, L.; Gambín, B.L. 2010. Caracterización fenotípica de una población de RILs (B73 x Mo17) de maíz para número de granos. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. La Plata, Buenos Aires, 26-29 de Septiembre. Pág.61.

- PRESENTACIONES ORALES EN REUNIONES CIENTÍFICAS
 - **Amelong, A.**; Gambín, B.L.; Borrás, L., 2014. Bases genéticas para la determinación del número de granos en maíz. 2° Taller de avances de las líneas de investigación del ámbito público y privado en los cultivos de soja y maíz, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, 27 de Febrero.
 - **Amelong, A.**; Gambín, B.L.; Borrás, L., 2012. QTLs behind critical eco-physiological traits for maize kernel number determination. Workshop: Physiological and Genetic Bases of Grain Yield Determination in Wheat and Maize, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 30 de Julio.

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE GRANOS EN UNA POBLACIÓN DE RILS EN MAÍZ

INDICE

Abreviaturas, símbolos y anglicismos	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Capítulo I: Introducción general	1
Producción de maíz en Argentina y en el mundo	1
Arquitectura genética de caracteres complejos	2
QTL: concepto	3
Estudios de QTL para número de granos por planta en maíz	4
Identificación de QTL sobre un modelo ecofisiológico	5
Determinación del número de granos a nivel de planta y canopeo	6
Enfoque aplicado en la presente tesis doctoral	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Hipótesis específicas	9
Capítulo II: Variabilidad fenotípica para parámetros ecofisiológicos de la determinación de número de granos en la población IBM (B73 x Mo17) Syn4	11
INTRODUCCIÓN	11
Objetivos específicos	12
Hipótesis específicas	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material vegetal utilizado	13
Diseño experimental y experimentos a campo	13
Mediciones fenotípicas	14
Parámetros del modelo ecofisiológico	15
Análisis estadístico	16
RESULTADOS	18
Diferencias en rendimiento, NGP y crecimiento	18

Diferencias entre RILs para los parámetros del modelo ecofisiológico	20
Diferencias genotípicas en porcentaje de esterilidad	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	28
Capítulo III: Análisis de QTL y predicción de número de granos	29
INTRODUCCIÓN	29
Objetivos específicos	31
Hipótesis específicas	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Construcción del mapa genético	32
Análisis de QTL	32
Predicción de BE y NGP	34
Diseño experimental y experimentos a campo	35
Mediciones fenotípicas	36
Análisis estadístico	36
Pasos para la predicción de BE y NGP	37
RESULTADOS	40
Análisis de QTL para BE y NGP	40
Análisis de QTL para los parámetros del modelo ecofisiológico	40
Predicción de BE y NGP	43
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
Capítulo IV: Discusión general	53
CONTRASTE DE HIPÓTESIS PLANTEADAS	55
Hipótesis específicas	55
INVESTIGACIONES FUTURAS	57
CONCLUSIONES FINALES	60
Referencias	62
Apéndice A	71

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

BE: biomasa de espiga acumulada 15 días después de 50% de antesis.

BE_b: umbral de la biomasa de espigas para la fijación de granos.

BIC: criterio de información bayesiana.

BLUP: mejor predictor lineal insesgado.

°C: grados centígrados.

C_{BE}: curvatura de la relación entre tasa de crecimiento y biomasa de espigas acumulada.

CIM: mapeo por intervalos compuestos.

C_{NG}: curvatura de la relación entre la biomasa de espigas acumulada y el número de granos.

cM: centimorgan.

d: día.

Exp: experimento.

H²: heredabilidad en sentido amplio.

ha: hectárea.

IBM: Intermated B73 x Mo17.

LOD: logaritmo de odds.

Maize GDB: "Maize Gene Data Base". Base de datos genéticos de maíz.

MIM: mapeo por intervalos múltiples.

N: nitrógeno.

NIL: "Near isogenic lines". Líneas isogénicas.

NGP: número de granos por planta.

P: fósforo.

PI_{BE}: pendiente inicial de la relación entre biomasa acumulada y tasa de crecimiento.

PI_{NG}: pendiente inicial de la relación entre número de granos y biomasa acumulada.

pl: planta.

QTL: "Quantitative trait loci". Loci de caracteres cuantitativos.

RIL: "Recombinant inbred line". Línea recombinante endocriada.

Stepwise: análisis de regresión por etapas.

TCP: tasa de crecimiento por planta alrededor del período de floración.

TCP_{50%}: tasa de crecimiento media.

TCP_b: umbral para la tasa de crecimiento para la acumulación de biomasa.

TCP_{CV}: coeficiente de variación de la tasa de crecimiento por planta.

TCP_{DE}: desvío estándar de la tasa de crecimiento.

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE GRANOS EN UNA POBLACIÓN DE RILS EN MAÍZ

Resumen

La mayor parte de las variaciones del rendimiento en maíz son explicadas por cambios en el número de granos fijados. El número de granos es dependiente de la biomasa acumulada en espiga (BE) alrededor de floración. Ambos son caracteres cuantitativos influenciados por el ambiente. La determinación de las bases genéticas de los caracteres cuantitativos resulta compleja producto de interacciones genotipo x ambiente. Los modelos ecofisiológicos son una posible solución a este problema ya que están diseñados para predecir interacciones genotipo x ambiente basándose en respuestas dinámicas de la variable en estudio. En la presente tesis se estudiaron las regiones cromosómicas (QTL) asociadas a la determinación de número de granos en maíz a nivel de planta a través de dos análisis de QTL diferentes: (i) sobre los caracteres finales *per se* (número de granos por planta, NGP, y biomasa acumulada en la espiga al final del período de floración, BE) y (ii) sobre parámetros específicos de un modelo ampliamente documentado que describe la respuesta del NGP y la BE al crecimiento por planta alrededor de floración. Se detectaron QTL para NGP, BE y los parámetros del modelo que relacionan NGP y BE con el crecimiento por planta para 125 RILs de la población IBM Syn4 (B73 x Mo17) evaluadas en dos ambientes. Posteriormente se evaluaron varias de estas RILs y otras líneas de la misma población que no estaban incluidas en el análisis de QTL con el objetivo de predecir la BE y el NGP basados en la información de QTL proveniente de cada análisis. La hipótesis a testear es que realizar un análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que describe la respuesta del NGP y la BE al crecimiento por planta alrededor de floración permitirá predecir estos rasgos de manera más robusta que usar información de QTL de los caracteres *per se*. Todos los caracteres mostraron variaciones significativas entre RILs y ambos análisis detectaron varios QTL para todos los caracteres. Los QTL asociados a BE y NGP *per se* no se localizaron en las mismas regiones que los QTL detectados para los parámetros del modelo. La información de QTL de los parámetros del modelo ayudó a predecir la BE y el NGP con mayor precisión ($r^2 = 0,13$ y $0,12$, $p < 0,001$, para BE y NGP, respectivamente) que predecir BE y NGP basados en los QTL detectados para los caracteres finales *per se* ($r^2 < 0,01$ y $< 0,01$, $p > 0,10$, para BE y NGP, respectivamente). Hay que destacar que la incorporación de información sobre el crecimiento de las plantas estuvo relacionada a la mejora de las predicciones en el enfoque que emplea el modelo ecofisiológico. En síntesis,

se identificaron regiones cromosómicas que incluyen genes potencialmente relevantes relacionados con la determinación de NGP en maíz y se empleó un enfoque que combina la información genética con un modelo ecofisiológico para predecir el NGP. La información obtenida ayudó a predecir el NGP sólo parcialmente, sugiriendo que son necesarios otros enfoques.

GENETIC BASIS OF KERNEL NUMBER DETERMINATION IN A MAIZE RIL POPULATION

Abstract

Most maize yield variations are explained by changes in the number of established kernels. Kernel number is dependent upon ear biomass accumulation around flowering. Both are quantitative traits highly influenced by the environment. Determining the genetic basis of quantitative traits is complex because of usual genetic \times environment interactions (G \times E). Crop physiology models are proposed to help overcome this problem, as they are structured to predict G \times E interactions based on dynamic responses. We studied the genetic basis of maize kernel number determination at the plant level by conducting two quantitative trait loci (QTL) analysis: (i) on final traits *per se* (kernel number per plant, KNP, and ear biomass, EB) and (ii) on specific model parameters of well-documented curves describing KNP and EB response to plant growth around flowering. Quantitative trait loci for KNP, EB and model parameters relating KNP and EB to plant growth were determined for 125 RILs of the IBM Syn4 (B73 \times Mo17) at two environments. We later grew several of these RILs and others from the same population not included in the QTL analysis and attempted to predict EB and KNP based on QTL information from each analysis. We hypothesized that doing the QTL analysis on crop physiology model parameters that describe the response of KNP and EB to plant growth is better than using direct QTL information. All traits showed significant variation, and both analyses detected several QTL for the studied traits. Associated QTL for EB and KNP *per se* did not localize with QTL detected for model parameters. This is the first report describing genomic regions for key physiological traits related to maize biomass partitioning around flowering and kernel set efficiency per unit of accumulated EB. The QTL information of model parameters helped predict accumulated EB and KNP with higher accuracy ($r^2= 0.13$ and 0.12 , $p<0.001$, for EB and KNP, respectively) than trying to predict EB and KNP based on QTL detected on final traits *per se* ($r^2< 0.01$ and <0.01 , $p>0.10$, for EB and KNP, respectively). Including information about plant growth on the crop physiology model approach was closely related to the increased accuracy over KNP predictions. As such, we identified chromosome areas including potentially relevant genes involved in maize KNP determination, but this information helped predict KNP at different environments only partially, suggesting other approaches might be needed.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Producción de maíz en Argentina y el mundo

El maíz (*Zea mays* L.) es originario de América, y es un cultivo ampliamente utilizado en todo el mundo (Kato et al., 2009). Es el cereal con mayor producción mundial, con un total aproximado de 1000 millones de toneladas para 2013 (<http://faostat3.fao.org>; verificado 12 de febrero de 2015). Es utilizado básicamente para tres fines: alimento para animales, alimento para humanos y uso industrial. Su uso industrial ha ido aumentando en los últimos años y se reconoce que de 43 mil productos en góndola que tiene un supermercado medio en Estados Unidos al menos un cuarto tienen algún subproducto de maíz en forma directa (Pollan, 2006).

Argentina se encuentra entre los productores mundiales más importantes de maíz, y es uno de las principales *commodities* producidos en el país después de la soja (<http://faostat3.fao.org>). A partir de 1970 se ha incrementado la producción nacional de maíz, alcanzando 33 millones de toneladas en la campaña 2013/2014. El aumento de la producción anual estuvo explicado por aumentos en el rendimiento promedio, el cual presentó una tasa de 116 kg ha⁻¹ año⁻¹ sin observarse grandes cambios en la superficie sembrada durante los últimos años (www.minagri.gob.ar; verificado 27 de diciembre de 2014). Al analizar el aumento en el rendimiento de los híbridos en Estados Unidos desde 1930 hasta 1990 Duvick (2001) explica que aproximadamente la mitad de este incremento está relacionado con mejoras en las prácticas agronómicas y la otra mitad está relacionada a la mejora genética.

Para garantizar la seguridad alimentaria en el mundo es de suma importancia el aumento en la producción de cultivos (Godfray y Garnett, 2014). Las posibles soluciones para aumentar la productividad están relacionadas a reducir las brechas de rendimiento entre lo alcanzable y lo obtenido, o aumentar los rendimientos potenciales a través de la genética de cultivos (Foley et al., 2011).

A pesar de ser un carácter complejo, todos los programas de mejoramiento comerciales actuales incluyen rendimiento como el parámetro de selección más importante. Debido a la naturaleza compleja de este carácter un mejor conocimiento de los

componentes que contribuyen a mayores rendimientos podría ayudar a mejorar los procesos de selección (Bruce et al., 2002).

Existe una gran diversidad en cómo los genotipos comerciales de maíz generan el rendimiento cuando éste es dividido en sus dos componentes, número de granos cosechados por unidad de superficie y peso promedio de estos (Otegui, 1995; Gambín et al., 2006). Ambos componentes del rendimiento son importantes, pero se reconoce al número de granos como el componente responsable de la mayor parte de las variaciones de rendimiento (Fig. I.1; Early et al., 1967; Otegui, 1995; Chapman y Edmeades, 1999). Actualmente se conoce poco sobre las bases genéticas que gobiernan las variaciones observadas en el número de granos. Menos se sabe sobre las bases genéticas que gobiernan las interacciones genotipo x ambiente de ambos componentes.

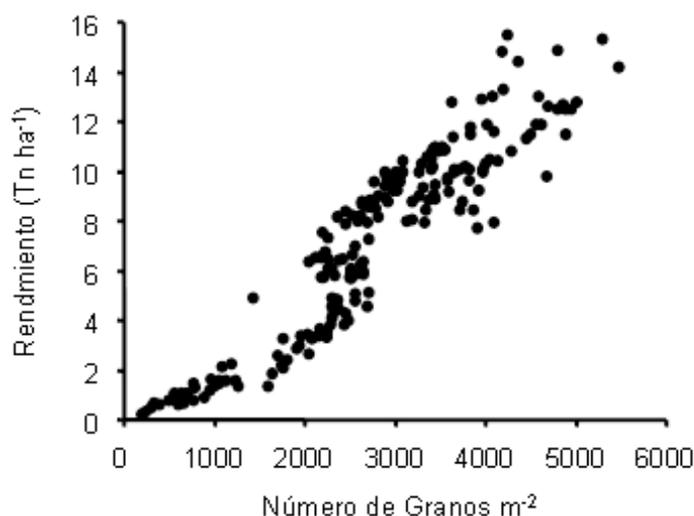


Figura I.1. Relación entre el rendimiento y el número de granos fijados en maíz (Borrás et al., 2004).

Arquitectura genética de caracteres complejos

Muchos de los caracteres de importancia agronómica, como el rendimiento, el número de granos o el peso de los granos, son caracteres cuantitativos complejos afectados por muchos genes, por el ambiente y que muestran interacciones entre los genes y el ambiente. La arquitectura genética se refiere al número y localización en el genoma de los genes que afectan un determinado carácter, la magnitud de sus efectos y la contribución relativa de los efectos aditivos, dominantes y epistáticos. Según Holland (2007) para

comprender la arquitectura de genes complejos en plantas los objetivos de las investigaciones futuras deben combinar diferentes avances en estadística, fisiología y herramientas genéticas.

La conexión entre genes y fenotipos puede enfocarse usando métodos de mayor a menor escala o “*top-down*”, o métodos de menor a mayor escala o “*bottom-up*” (Hammer et al., 2006). Se ha anticipado que el tipo de enfoque “*bottom-up*”, o partir de genes, permitiría una mejora en la eficiencia del mejoramiento de cultivos. Sin embargo, para caracteres complejos no se ha cumplido. Integrar los efectos de genes y sus interacciones a lo largo de diferentes escalas de organización hasta finalmente predecir un fenotipo complejo puede resultar errático y sumamente complejo. Existen diferentes regulaciones en cada uno de los niveles que no permiten escalar directamente desde el gen al fenotipo (Hammer et al., 2006). Los métodos “*top-down*” comienzan con el fenotipo y usan la disección fisiológica para llegar al nivel genómico molecular (Hammer et al., 2004). Este es el enfoque clásico usado para estudiar la arquitectura genética de los caracteres complejos, primero observar variación fenotípica y luego intentar determinar un modelo genético adecuado para explicar la variación fenotípica (Reymond et al., 2003; Messina et al., 2009).

QTL: concepto

Las regiones cromosómicas que controlan los caracteres cuantitativos son comúnmente referidas como QTL (loci de caracteres cuantitativos). Es posible localizar un QTL en el genoma y estimar su efecto asociando el carácter de interés con marcadores moleculares de ADN (Tanksley, 1993). El mapeo de QTL ha demostrado ser una herramienta clave para estudiar la arquitectura de caracteres complejos en plantas. Un requisito para localizar un QTL en el genoma es contar con un mapa de ligamiento de marcadores moleculares. Este tipo de estudios se ha incrementado a partir de la década de 1980, con el desarrollo de este tipo de marcadores. Para la mayoría de las especies cultivadas importantes ya existen mapas de ligamiento (Hackett, 2002).

Para construir un mapa de ligamiento pueden usarse diferentes tipos de poblaciones (i.e., F₂, retrocruzas, dobles haploides, líneas recombinantes, etc.). Es crítico que existan suficientes polimorfismos y contar con marcadores moleculares que revelen estas diferencias. Los polimorfismos en el ADN surgen de diferentes tipos de mutaciones, ya sean mutaciones puntuales, re-arreglos cromosómicos (inserciones o deleciones), apareamiento desigual y errores de la ADN polimerasa, que pueden detectarse a través de los marcadores moleculares (Collard et al., 2005).

Existen diferentes métodos para detectar QTL (e.g., análisis de un único marcador, análisis por intervalos simples, análisis por intervalos compuestos; Collard et al., 2005). El método más simple es el análisis de un solo punto o un solo marcador. No requiere un mapa de ligamiento completo y puede realizarse con métodos estadísticos básicos (Tanksey, 1993). El análisis por intervalos analiza simultáneamente pares adyacentes de marcadores ligados a lo largo de los cromosomas. El uso de marcadores ligados compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL (Lander y Botstein, 1989). El mapeo por intervalos compuestos (CIM) combina el mapeo por intervalos con regresión lineal. Este incluye marcadores genéticos adicionales en el modelo estadístico sumados al par adyacente de marcadores ligados para el mapeo por intervalos. Al evaluar posibles QTL en un intervalo, se usan otros marcadores como covariables para controlar otros QTL y reducir la variancia residual, resultando más preciso y efectivo (Jansen, 1993; Zeng, 1994). El mapeo por intervalos múltiples (MIM) usa simultáneamente múltiples intervalos de marcadores para insertar directamente múltiples QTL posibles en el modelo, resultando más potente y preciso. La variancia genética en el modelo utilizado para MIM no sólo está determinada por el efecto aditivo de cada QTL individual sino también por la covariancia genética entre los QTL del modelo. Al tratarse de un modelo de múltiples QTL se informa un r^2 general para cada carácter y no individualmente para cada QTL (Kao, 1999).

Estudios de QTL para número de granos por planta en maíz

Existen numerosos estudios previos sobre número de granos por planta (NGP) o caracteres similares en maíz (e.g., Beavis et al., 1994a, Ribaut et al., 1997; Agrama et al., 1999; Frova et al., 1999; Frascaroli et al., 2009; Li et al., 2010; Liu et al., 2010; Peng et al., 2011). La mayoría de estos estudios fueron realizados sobre poblaciones biparentales o comparando diferentes materiales genéticos, con condiciones contrastantes generadas por distintos factores (e.g., disponibilidad hídrica, nitrógeno, fósforo). En general los resultados de estos estudios no fueron consistentes al ser evaluados en distintos ambientes. Sin embargo, existen casos exitosos para caracteres relacionados, sobre todo para caracteres de alta heredabilidad. Un ejemplo es el trabajo de Bommert et al. (2013), donde identificaron un gen candidato relacionado con el número de hileras por espiga. A pesar de esto, es sabido que la heredabilidad del rendimiento y su principal componente (i.e., número de granos por metro cuadrado) es mediana a baja dependiendo del ambiente y método de estimación (entre 0,3 y 0,6; Bolaños y Edmeades, 1996; Veldboom y Lee, 1994).

Si bien se cuenta con una gran cantidad de información genotípica para el estudio de la determinación del número de granos, poco se sabe de las causas genéticas detrás de la variabilidad que existe en genotipos comerciales y no comerciales. La elevada capacidad actual de caracterizar genotípicamente grandes cantidades de individuos no se corresponde con la capacidad de caracterizar el fenotipo, o la capacidad de entender los vínculos entre la información genotípica y fenotípica (Campos et al., 2004; Bernardo, 2008).

Identificación de QTL sobre un modelo eco-fisiológico

Bernardo (2008) considera que las interacciones genotipo x ambiente son la principal causa de las discrepancias en los resultados de los estudios de QTL para caracteres complejos. Esta falta de consistencia puede estar relacionada con la necesidad de disectar los caracteres complejos en caracteres más simples (Slafer, 2003). Muchos de los QTL identificados tienen un uso limitado en el mejoramiento aplicado. La causa de esto es que los QTL son dependientes de su fondo genético (Alvarez Prado et al., 2014) y del ambiente, y en general no se conoce como son afectados (Campos et al., 2004).

Una posible solución para resolver las interacciones genotipo x ambiente es usar modelos inspirados en procesos fisiológicos (Hammer et al., 2006). Estos modelos son ecuaciones con parámetros específicos que describen la respuesta del carácter al ambiente. Estas curvas de respuesta varían para diferentes genotipos, como así también los parámetros de las ecuaciones. Estos parámetros permiten conectar el ambiente con el carácter final. Existen varios trabajos que han estudiado las bases genéticas de distintos caracteres a través de modelos ecofisiológicos en diversos cultivos. Reymond et al. (2003) determinaron las bases genéticas (QTL) de los parámetros de las curvas de respuesta del rasgo de interés (tasa de elongación foliar) al ambiente y estimó el carácter con el efecto de los QTL de cada parámetro e información ambiental. Si el modelo captura adecuadamente los determinantes fisiológicos de la variación genética es posible predecir el carácter de interés en diferentes ambientes para cada genotipo. Las ecuaciones y los parámetros son el enlace entre el ambiente y el genotipo. Otros ejemplos de este enfoque fueron reportados para crecimiento de hojas en arroz (*Oryza sativa* L.; Wu et al., 2002), elongación de hojas en maíz (Reymond et al., 2003), tiempo a floración en cebada (*Hordeum vulgare* L.; Yin et al., 2005), tolerancia a sequía en maíz (Messina et al., 2011) y emergencia de sorgo en diferentes temperaturas (*Sorghum bicolor* L. Moench; Fiedler et al., 2012).

En esta tesis doctoral se estudia la determinación del NGP en maíz siguiendo un enfoque similar al aplicado por Reymond et al. (2003) para estudiar la tasa de elongación

foliar. El desarrollo de modelos ecofisiológicos que relacionan el NGP con la acumulación de biomasa en la espigas y la tasa de crecimiento por planta alrededor de floración brindan una oportunidad para explorar las bases genéticas del NGP. El enfoque permite conectar variaciones ambientales con parámetros específicos dependientes del genotipo.

Determinación del número de granos a nivel de planta y canopeo

La determinación del NGP puede analizarse como el resultado de dos procesos (Andrade et al., 1999; Vega et al., 2001; Echarte et al., 2004; Borrás et al., 2007; Pagano y Maddonni, 2007; D'Andrea et al., 2008): (i) la acumulación de biomasa en la espiga (BE) alrededor de floración, el cual depende de la tasa de crecimiento (TCP) por planta y de cuánto se ese crecimiento se destina a la estructura reproductiva (Fig. 1.2A), y (ii) la eficiencia de fijación de granos por unidad de biomasa de espiga (Fig. 1.2B). El primer proceso representa la partición a la estructura reproductiva que lleva los granos, y el segundo proceso representa la eficiencia de fijación de granos. Ambos procesos han mostrado grandes variaciones genotípicas (i.e., Echarte et al., 2004; Echarte y Tollenaar, 2006; Borrás et al., 2009). Actualmente se reconoce que cada genotipo muestra una curva particular para la relación entre el NGP y la TCP alrededor de floración (Tollenaar et al., 1992; Echarte et al., 2004; Gambín et al., 2008) dependiendo de la mencionada partición de biomasa a espiga (Fig. 1.2A) y la eficiencia con que esta biomasa es utilizada en fijar granos (Fig. 1.2B).

A nivel de canopeo la determinación del número de granos por unidad de superficie requiere la comprensión de que todas las plantas no tienen igual tasa de crecimiento alrededor de floración. La variabilidad entre las plantas dentro de un canopeo es un factor importante a considerar (Tollenaar y Wu, 1999; Pagano y Maddonni et al., 2007; Borrás et al., 2007). Dos canopeos que muestran igual TCP media alrededor de floración pero diferente variación entre plantas difieren en el número de granos por metro cuadrado. Esto se debe a que las plantas que muestran altas TCP no compensan el crecimiento perdido por las plantas con baja TCP. La causa de este fenómeno es la relación curvilínea existente entre la TCP alrededor de floración y el NGP establecido (Vega et al., 2001). Es por este motivo que la determinación del número de granos por unidad de superficie requiere primero un estudio a nivel de planta individual para luego integrar el canopeo completo.

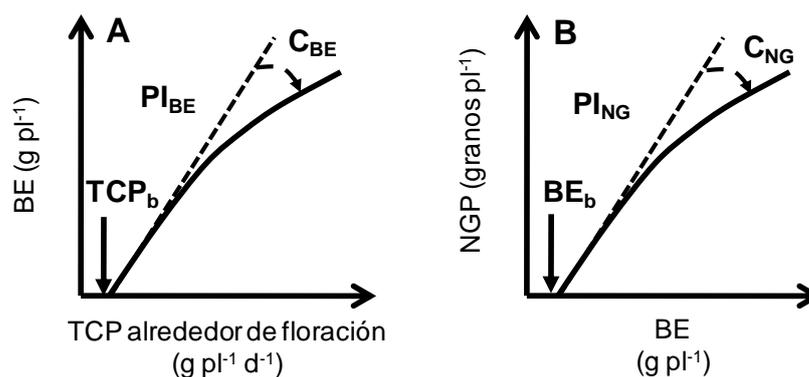


Figura 1.2. Diagrama que describe el modelo ecofisiológico para la determinación del número de granos por planta (NGP) y la biomasa de espiga acumulada al final del período de floración (BE) (basado en Borrás et al., 2007). (Fig. A) La relación entre BE y tasa de crecimiento por planta alrededor de floración (TCP) está definida por un umbral de la tasa de crecimiento por planta (TCP_b) para la acumulación de BE, pendiente inicial (PI_{BE}) y curvatura (C_{BE}), que son dependientes del genotipo. (Fig. B) La relación entre NGP y BE está definida por un umbral de BE para la fijación de granos (BE_b), pendiente inicial (PI_{NG}) y la curvatura (C_{NG}), todos ellos genotipo-dependientes.

La respuesta de la BE a cambios en la TCP alrededor de floración (Fig. 1.2A) puede presentar un patrón lineal o curvilíneo dependiendo del genotipo y del rango de TCP explorado (Pagano y Maddonni, 2007; Borrás et al., 2007; D'Andrea et al., 2008). Recientemente Borrás et al. (2009) identificaron y cuantificaron los parámetros que caracterizan esta respuesta para un conjunto de líneas e híbridos comerciales. Los parámetros identificados son tres (Fig. 1.2A) (i) un umbral de TCP por debajo del cual no hay acumulación de biomasa en la espiga (TCP_b), (ii) una pendiente inicial de respuesta de la BE a aumentos en la TCP alrededor de floración (PI_{BE}), y (iii) un parámetro que define la curvatura de la relación a altas TCP alrededor de floración (C_{BE}). Los parámetros mostraron importante variabilidad entre genotipos (Borrás et al., 2009). Esta variabilidad también puede encontrarse en otros trabajos con materiales genéticos diversos (Echarte et al., 2004; Pagano y Maddonni, 2007; Borrás et al., 2007; Hernández et al., 2014).

La respuesta del NGP a cambios en la BE (Fig. 1.2B) también puede presentar un patrón lineal o curvilíneo dependiendo del genotipo (Vega et al., 2001; Echarte et al., 2004). Tres parámetros caracterizan esta respuesta (Fig. 1.2B): (i) un umbral de BE para la fijación de granos (BE_b), (ii) una pendiente inicial de respuesta del NGP a aumentos en la BE (PI_{NG}), y (iii) un parámetro que define la curvatura de la relación (C_{BE}). Las diferencias entre

genotipos en esta respuesta sugiere importantes diferencias en todos los parámetros (Echarte et al., 2004; Echarte y Tollenaar, 2006).

La importancia de estos parámetros puede apreciarse al analizar el resultado de estudios retrospectivos sobre el efecto del mejoramiento tradicional por rendimiento en grano. Varios estudios muestran que el mejoramiento ha producido cambios en la respuesta del NGP a la TCP alrededor de floración. Existen trabajos que muestran reducciones en el valor umbral de TCP necesario para fijar granos y mayores eficiencias de fijación de granos por unidad de TCP alrededor de floración y BE acumulada en genotipos modernos (Echarte et al., 2004; Luque et al., 2006). La reducción del umbral de TCP necesario para fijar granos implica reducciones en el umbral a partir del cual hay acumulación de biomasa en la espiga (TCP_b). De la misma manera, una mayor fijación de granos por unidad de TCP está asociada tanto a una mayor BE (que implica cambios en los parámetros PI_{BE} y C_{BE}) como a una mayor eficiencia de fijación de granos por unidad de BE (que implica cambios en los parámetros PI_{NG} y C_{NG}) (Echarte et al., 2004; Luque et al., 2006).

Enfoque aplicado en la presente tesis doctoral

En el presente trabajo de tesis se estudiaron las bases genéticas de la determinación de NGP en maíz con dos enfoques diferentes: (i) con un análisis de QTL sobre los caracteres finales *per se* (NGP y BE) y (ii) análisis de QTL sobre los parámetros de las curvas del modelo que describen la respuesta de NGP y BE a la TCP alrededor de floración. El primer enfoque representa la forma tradicional de analizar los caracteres cuantitativos, que es realizar el análisis genético a partir de los datos del carácter de interés directamente. El segundo enfoque está basado en un marco fisiológico similar al que fue recientemente incorporado en simulaciones de programas de mejoramiento comerciales actuales (Messina et al., 2011). Ambos enfoques fueron realizados con el fin de comparar el valor del segundo enfoque con respecto al enfoque tradicional.

La variabilidad genotípica y fenotípica se estudió en una población de líneas endocriadas recombinantes (RILs) generada a partir de cuatro ciclos de recombinación luego de la F_2 , que proviene de la cruce de dos líneas endocriadas (B73 y Mo17; IBM Syn 4) de alta relevancia para el mejoramiento del cultivo (Troyer, 1999; Mikel y Dudley, 2006) y contrastantes para el NGP (Abertondo, 2007).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Determinar las bases genéticas (QTL) asociadas con la determinación del número de granos en una población de RILs de maíz.

Objetivos específicos

- Realizar una caracterización fenotípica de una población de RILs para NGP, BE y los parámetros del modelo ecofisiológico que describe los procesos determinantes de NGP y BE. Estos parámetros son:
 - TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , que definen la respuesta de la BE ante variaciones en la TCP alrededor de floración.
 - BE_b , PI_{NG} y C_{NG} , que definen la respuesta del NGP ante variaciones en la acumulación de BE.
- Realizar un análisis genético (QTL) sobre NGP y BE *per se* y sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que relaciona NGP, BE y TCP durante el período alrededor de floración.
- Utilizar la información genotípica (QTL) para predecir NGP y BE a partir de dos enfoques diferentes:
 - Análisis de QTL sobre los caracteres BE y NGP *per se*.
 - Análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que relacionan NGP, BE y TCP durante el período de floración.

Hipótesis específicas

- Las líneas de la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17) difieren en el NGP a madurez y BE acumulada alrededor de floración.
- Las líneas de la población de RILs muestran diferencias en los parámetros que definen las respuestas de acumulación de la BE ante variaciones en la TCP

alrededor de floración (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE}) y del NGP ante variaciones en la BE acumulada (BE_b , PI_{NG} y C_{NG}).

- Existen QTL asociados con los caracteres NGP y BE *per se* y con los parámetros del modelo ecofisiológico para la relación entre NGP, BE y TCP durante el período de floración.
- Las regiones cromosómicas (o QTL) asociadas a los parámetros ecofisiológicos de la determinación del NGP son coincidentes con regiones asociadas a los caracteres NGP y BE *per se*.
- La información de un análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que describe la respuesta de NGP a diferentes condiciones de crecimiento de planta mejora la capacidad de predicción de NGP y BE en diferentes condiciones ambientales respecto a predicciones a partir de información de un análisis de QTL sobre NGP y BE *per se*.

CAPÍTULO II

VARIABILIDAD FENOTÍPICA PARA PARÁMETROS ECOFISIOLÓGICOS DE LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE GRANOS EN LA POBLACIÓN IBM Syn4 (B73 x Mo17)

INTRODUCCIÓN

El número de granos es el carácter que mejor explica las variaciones en rendimiento en maíz (Early et al., 1967; Otegui, 1995; Chapman y Edmeades, 1999). Entender y predecir el número de granos por planta (NGP) o por superficie para diferentes genotipos y ambientes es importante para guiar el mejoramiento y manejo del cultivo para maximizar los rendimientos.

Las diferencias en el NGP están normalmente relacionadas a la TCP durante ca. 30 días alrededor de floración (Otegui y Bonhomme, 1998; Andrade et al., 1999). La curva de respuesta de NGP a TCP alrededor de floración es comúnmente analizada como el resultado de dos procesos independientes (Andrade et al., 1999; Echarte et al., 2004; Borrás et al., 2007; Pagano y Maddonni, 2007; D'Andrea et al., 2008). El primero es la relación entre el NGP y la BE. El segundo es la relación entre la BE y la TCP alrededor de floración. La primera relación es usualmente identificada con la eficiencia de fijación de granos por unidad de biomasa reproductiva acumulada, y la segunda representa la partición de biomasa a la estructura reproductiva que porta los granos (Vega et al., 2001).

Existen evidencias que los parámetros del modelo que describen ambas curvas (Fig. I.2) son específicos de cada genotipo. En diferentes estudios se describen parámetros específicos que relacionan la biomasa de tejidos reproductivos en relación al crecimiento de las plantas, y su efecto en el número de granos establecido. Echarte et al. (2004) evaluaron seis híbridos liberados entre 1965 y 1993. Los híbridos más nuevos fijaron más NGP por unidad de TCP debido a un menor umbral de TCP para la fijación de granos y un mayor número potencial de granos en condiciones de alta disponibilidad de recursos. Posteriormente Echarte y Tollenaar (2006) describieron parámetros de la relación de NGP vs. TCP alrededor de floración para dos híbridos y sus líneas parentales, y encontraron diferencias para los parámetros que describen esta relación. Borrás et al. (2009) evaluaron variaciones en la BE en relación a la TCP alrededor de floración en 13 genotipos (incluyendo

líneas e híbridos) y encontraron diferencias significativas entre genotipos en todos los parámetros del modelo. Hernández et al. (2014) evaluaron 11 genotipos comerciales de Argentina actuales y encontraron diferencias genotípicas para todos los parámetros del modelo. En síntesis, todos los estudios existentes en relación a mecanismos asociados con la determinación del NGP están realizados en un número acotado de híbridos comerciales o líneas endocriadas nunca superando los 40 genotipos evaluados (i.e., Echarte et al., 2006; Pagano y Maddonni, 2007; Borrás et al., 2007; Borrás et al., 2009; Hernández et al., 2014).

Las RILs de la población IBM Syn4 (B73 x Mo17) varían para NGP, pero poco se sabe de los mecanismos que determinan estas diferencias entre genotipos. También presentan variabilidad para altura de planta y tamaño de espiga (Abertondo, 2007), pero no existe información sobre las respuestas del NGP a la BE, de la BE a la TCP alrededor de floración y los parámetros asociados a estas respuestas. No existen reportes que describan la posible variabilidad existente sobre los parámetros del modelo ecofisiológico para una población de RILs segregante.

Objetivos específicos

- Realizar una caracterización fenotípica de una población de RILs para NGP, BE y los parámetros del modelo ecofisiológico que describe los procesos determinantes de NGP y BE. Estos parámetros son:
 - TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , que definen la respuesta de la BE ante variaciones en la TCP alrededor de floración.
 - BE_b , PI_{NG} y C_{NG} , que definen la respuesta del NGP ante variaciones en la acumulación de BE.

Hipótesis específicas

- Las líneas de la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17) difieren en el NGP a madurez y BE acumulada alrededor de floración.
- Las líneas de la población de RILs muestran diferencias en los parámetros que definen las respuestas de acumulación de la BE ante variaciones en la TCP alrededor de floración (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE}) y del NGP ante variaciones en la BE acumulada (BE_b , PI_{NG} y C_{NG}).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

Se utilizaron las dos líneas parentales públicas B73 y Mo17, y líneas provenientes de la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17). B73 y Mo17 son líneas endocriadas referentes para el mejoramiento mundial de maíz (Troyer, 1999; Mikel y Dudley, 2006) y B73 fue secuenciada y utilizada para una gran cantidad de estudios académicos y privados (Schnable et al., 2009). En la generación F₂ esta población fue sometida a cuatro ciclos de recombinación al azar. Luego se generaron líneas recombinantes derivadas de ocho ciclos de autopolinización (Lee et al., 2002). Los datos de marcadores genotípicos (RFLP, SSR, ESTs-SSR, INDELS, SNPs, etc) y otros detalles correspondientes a las líneas de la población IBM Syn4 se pueden encontrar en la página web Maize GDB. La población se ha convertido en una referencia en maíz para diferentes estudios de mapeo (www.maizegdb.org; verificada el 1 de Marzo de 2014).

Las líneas parentales Mo17 y B73 muestran diferencias para NGP (Abertondo, 2007; Severini et al., 2011), TCP alrededor de floración y BE (Borrás et al., 2009; Severini et al., 2011). Además, B73 y Mo17 difieren en los parámetros del modelo propuesto que describe la partición de biomasa a espiga alrededor de floración (Fig. 1.2; Borrás et al., 2009). Las RILs asimismo difieren en el NGP (Abertondo, 2007).

Las líneas fueron incrementadas en la Estación Experimental de Nidera S.A. (Venado Tuerto, Argentina) localizada a 133 km de los ensayos realizados en la Fac. de Cs. Agrarias de la Universidad de Rosario en Zavalla. Las semillas se produjeron por autopolinización y fueron agrupadas por surco.

Diseño experimental y experimentos a campo

Se llevaron a cabo dos experimentos (Exps.) en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Argentina (33°01S, 60°52O).

Los Exps. I y II fueron sembrados el 14 de Septiembre de 2009 y el 4 de Octubre de 2010, respectivamente. Un total de 125 RILs y los padres de IBM Syn4 fueron evaluados en los Exps. I y II.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones en ambos Exps. Las parcelas fueron raleadas en V2-V3. En los Exps. I y II la densidad de plantas fue 5 y 7,5 pl m², respectivamente. Las parcelas consistieron en cuatro surcos a 0,70 m de distancia y 6 m de largo. Se aplicó fertilizante cuatro a cinco días antes de la siembra a una dosis de 100 kg ha⁻¹ de N y 80 kg ha⁻¹ de S. A la siembra se incorporaron 18 kg ha⁻¹ de N y 83 kg ha⁻¹ de P. El área experimental fue mantenida libre de malezas e insectos. Los experimentos fueron conducidos sin limitaciones hídricas visibles. El Exp. II fue regado con un sistema de riego por aspersión durante floración y principio de llenado de granos con 150 mm. En el Exp. I no fue necesario regar ya que ocurrieron lluvias a lo largo del cultivo y no se manifestaron signos visibles de estrés hídrico.

Mediciones fenotípicas

La TCP para cada genotipo fue determinada en 15 plantas por repetición en ambos Exps. Estas plantas fueron marcadas ca. 15 días antes del 50% de antesis y fueron siempre plantas consecutivas de los surcos centrales. Se utilizaron modelos alométricos no destructivos (Vega et al., 2000) para estimar la biomasa de las plantas marcadas en pre- y post-floración. Las muestras de biomasa en pre-floración fueron tomadas ca. 10 días antes de 50% de antesis. El enfoque alométrico fue utilizado para estimar la acumulación de biomasa, la partición y la fijación de granos a nivel de planta individual. Esta técnica ha sido utilizada exitosamente para brindar una representación adecuada de la biomasa en distintos momentos de plantas que se mantienen en el campo hasta la cosecha (Vega et al., 2000; Echarte et al., 2004; Gambín et al., 2006). Los modelos pre- y post-floración fueron desarrollados usando nueve plantas marcadas adicionales para cada momento por genotipo. Para cada modelo se muestrearon tres plantas de los surcos externos en cada repetición. El modelo pre-floración se basó en una regresión lineal entre la biomasa aérea y el volumen del tallo (Vega et al., 2001; Gambín et al., 2006). El volumen del tallo fue calculado a partir de la altura de planta (desde el nivel del suelo hasta la vaina de la hoja superior) y el diámetro de la base del tallo. Los valores de r² para este modelo estuvieron en un rango entre 0,72 a 0,98 (p<0,001, n= 9) para todos los genotipos y años. La muestra de biomasa en post-floración fue tomada 15 días después de 50% de antesis y el modelo alométrico incluyó el volumen de tallo y el diámetro máximo de la espiga apical con chalas (Vega et al, 2001; Gambín et al., 2006), y fue estimada utilizando una regresión lineal múltiple. Los valores de r² para este modelo estuvieron en un rango entre 0,51 a 0,99, con

una media de 0,84 para el Exp. I y una media 0,92 para el Exp. II ($p < 0,001$, $n = 9$). La biomasa del tallo se determinó luego de cortar las plantas y secarlas en una estufa a 65 °C durante un mínimo de 7 días. Estos modelos también fueron utilizadas para estimar la BE. Los valores de r^2 estuvieron en un rango entre 0,54 a 0,99 ($p < 0,001$, $n = 9$).

La TCP alrededor de floración ($\text{g pl}^{-1} \text{d}^{-1}$) fue calculada como la diferencia entre la biomasa por planta en post-floración y la biomasa por planta en pre-floración (g pl^{-1}) dividido por el número de días entre muestreos. La variabilidad planta a planta en la TCP alrededor de floración fue determinada para cada parcela (desvío estándar de la TCP; TCP_{DE}).

Las espigas de las plantas marcadas fueron cosechadas en madurez fisiológica (definida como el 75% de la línea de leche; Hunter et al., 1991). Los granos por planta fueron contados manualmente. Las espigas fueron secadas en estufa y desgranadas manualmente. Las plantas con menos de diez granos en madurez fueron consideradas estériles (Tollenaar et al., 1992). La esterilidad de plantas fue determinada como el porcentaje (%) de plantas estériles por parcela. La prolificidad fue estimada como el número de espigas promedio por planta (espigas pl^{-1}) por parcela. El rendimiento se determinó por planta (g pl^{-1}) y por superficie (Tn ha^{-1}).

Parámetros del modelo ecofisiológico

El modelo utilizado relaciona el NGP con la TCP alrededor de floración basado en una versión modificada de Borrás et al. (2009). La determinación del NGP fue analizada en dos procesos diferentes. Primero, la curva de respuesta de la BE a la TCP fue analizada con una función hiperbólica (Ecs. [1] y [2]):

$$\text{BE} = 0 \quad \text{si } \text{TCP} \leq \text{TCP}_b \quad [1]$$

$$\text{BE} = [\text{PI}_{\text{BE}} (\text{TCP} - \text{TCP}_b)] / [1 + \text{C}_{\text{BE}} (\text{TCP} - \text{TCP}_b)] \quad \text{si } \text{TCP} > \text{TCP}_b \quad [2]$$

donde PI_{BE} es la pendiente inicial de la curva de respuesta de la BE a la TCP. La TCP_b es la TCP alrededor de floración base para la acumulación de BE y la C_{BE} define la curvatura de la relación a altas TCP alrededor de floración (Fig. 1.2A).

Segundo, la curva de respuesta del NGP a la BE fue analizada con una función hiperbólica similar a [1] y [2] (Ecs. [3] y [4]):

$$\text{NGP} = 0 \quad \text{si } \text{BE} \leq \text{BE}_b \quad [3]$$

$$\text{NGP} = [\text{PI}_{\text{NG}} (\text{BE} - \text{BE}_b)] / [1 + \text{C}_{\text{NG}} (\text{BE} - \text{BE}_b)] \quad \text{si } \text{BE} > \text{BE}_b \quad [4]$$

donde BE_b es la BE base para la fijación de granos, PI_{NG} es la pendiente inicial del NGP vs. BE y C_{NG} la curvatura de la relación (Fig. 1.2B).

Estas relaciones fueron construidas utilizando las plantas marcadas de 125 RILs, combinando los datos de los Exps. I y II (90 plantas por cada RIL, correspondientes a 15 plantas por repetición, tres repeticiones por experimento y dos ambientes). Las ecuaciones fueron ajustadas individualmente para cada genotipo y se obtuvieron los parámetros correspondientes a la relación entre BE y TCP (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE}) y a la relación entre NGP y BE (BE_b , PI_{NG} y C_{NG}).

Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la variabilidad individual de cada carácter se utilizó un modelo lineal generalizado para cada carácter individualmente. Para este análisis se utilizó PROC GLM de SAS® (SAS Institute, 1999). Los genotipos coincidentes fueron analizados en conjunto y el modelo incluyó ambientes (años), repeticiones anidadas dentro de ambientes, genotipos y la interacción genotipo x ambiente. Los ambientes y las repeticiones dentro de ambientes fueron considerados efectos fijos, mientras que los genotipos y la interacción genotipo x ambiente fueron considerados efectos aleatorios. Las medias individuales fueron comparadas con una prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

La heredabilidad en sentido amplio de cada parámetro se calculó en base a medias (Ec. [5]):

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{[\sigma_G^2 + \sigma_{GE}^2/ra + \sigma_e^2/r]} \quad [5]$$

donde σ_G^2 es la variancia genotípica, σ_{GE}^2 es la variancia genotipo x ambiente, σ_e^2 es la variancia residual a es el número de ambientes y r es el número de repeticiones (Hallauer et al., 2010). Para las estimaciones de heredabilidad los parámetros fueron calculados combinando cada repetición de los Exps. I y II ($n=30$) y no incluyen un término para la

interacción genotipo x ambiente ya que no pudo ser estimado. La heredabilidad en sentido amplio de los demás caracteres estudiados se calculó a partir de los datos de los Exps. I y II.

La esterilidad es un atributo de importancia en el cultivo de maíz (Edmeades y Daynard, 1979) y aquí se estudió la relación entre la esterilidad con rasgos asociados a su expresión como la TCP alrededor de floración, el coeficiente de variación de la TCP y el parámetro del modelo ecofisiológico planteado que describe el umbral para la acumulación de BE (TCP_b). Se utilizó el coeficiente de variación de la TCP, en lugar del desvío estándar, ya que es comparable entre los genotipos independientemente del valor de TCP medio. Con el fin de obtener un ordenamiento visual de los diferentes genotipos y las relaciones entre caracteres se llevó a cabo un *biplot* entre genotipos y caracteres con el programa R (R Core Team, 2013). Debido a las diferentes escalas entre caracteres, los datos fueron normalizados previo al análisis (Yan y Rajcan, 2002). La normalización se realizó restando a cada valor la media de cada caracter y posteriormente dividiendo por su desvío estándar.

RESULTADOS

Diferencias en rendimiento, NGP y crecimiento

Un total de 125 RILs fueron fenotipeadas para rendimiento por unidad de superficie, rendimiento por planta, NGP, BE, TCP alrededor de floración, TCP_{DE}, esterilidad y prolificidad durante dos condiciones de crecimiento. En la Tabla II.1 se describen los valores promedio y la variación encontrada en las RILs para cada carácter. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre genotipos e interacción genotipo x año significativa para todos los caracteres ($p < 0,001$). En este caso, esta interacción indica una modificación en el ranking de los genotipos en los diferentes años en cada carácter. Las diferencias entre los valores medios entre los Exps. I y II para rendimiento y los demás caracteres indica que los dos ambientes (años) permitieron explorar diferentes condiciones de crecimiento. Los rendimientos por superficie de los distintos genotipos variaron entre 2,2 a 6,0 Tn ha⁻¹ en el Exp. I y de 1,0 a 5,5 Tn ha⁻¹ en el Exp. II. El rendimiento por planta varió entre 43 a 120 gr pl⁻¹ en el Exp. I y entre 13 a 73 en el Exp. II. El NGP varió entre 201 a 654 granos pl⁻¹ en el Exp. I y entre 69 y 396 granos pl⁻¹ en el Exp. II. Las diferencias entre genotipos en NGP estuvieron positivamente correlacionadas con las diferencias en rendimiento por planta ($r^2 = 0,84$; $p < 0,001$; $n = 250$).

La TCP alrededor de floración también mostró diferencias significativas entre ambientes y genotipos ($p < 0,001$), y una interacción genotipo x ambiente significativa ($p < 0,001$). La TCP varió de 2,2 a 5,5 g pl⁻¹ d⁻¹ y de 1,3 a 3,2 g pl⁻¹ d⁻¹ para los Exps. I y II, respectivamente. El desvío estándar de la TCP (TCP_{DE}) varió entre 0,2 a 2,1 g pl⁻¹ d⁻¹ y entre 0,3 a 1,7 g pl⁻¹ d⁻¹ para los Exps. I y II, respectivamente. Los valores promedio de TCP_{DE} fueron 0,7 g pl⁻¹ d⁻¹ para el Exp. I y 0,6 g pl⁻¹ d⁻¹ para el Exp. II (Tabla II.1).

La BE acumulada 15 días después de anthesis varió entre 7,2 a 34,8 g pl⁻¹ en el Exp. I. En el Exp. II el rango fue entre 2,8 a 18,0 g pl⁻¹ (Tabla II.1). En el Apéndice A (Fig. 1) se muestran las distribuciones de NGP, BE y TCP alrededor de floración en los Exp. I y II.

Los valores de esterilidad de cada genotipo mostraron un rango entre 0 a 17,6 % y entre 0 a 59,5 % para los Exps. I y II respectivamente. La prolificidad de cada genotipo mostró un rango entre 0,82 y 1,84 espigas pl⁻¹ y entre 0,40 y 1,40 espigas pl⁻¹ para los Exps. I y II, respectivamente (Tabla II.1).

En síntesis, los genotipos y los ambientes mostraron variaciones significativas para todos los caracteres fenotipeados.

Tabla II.1. Datos fenotípicos de y de variancias de rendimiento por planta, número de granos por planta (NGP), tasa de crecimiento por planta (TCP) alrededor de floración promedio, desvío estándar de la TCP (TCP_{DE}), biomasa de espigas 15 días después de antesis (BE), esterilidad y prolificidad de 125 RILs de los Exps. I y II utilizados para el análisis de QTL.

Exp.		Rendimiento		NGP	TCP alrededor de floración	TCP _{DE}	BE	Esterilidad	Prolificidad
		Tn ha ⁻¹	g pl ⁻¹	granos pl ⁻¹	g pl ⁻¹ d ⁻¹	g pl ⁻¹ d ⁻¹	g pl ⁻¹	%	espigas pl ⁻¹
I	Media	4,7	89	401	3,4	0,7	18,0	1,8	1,09
	Mín.	2,2	43	201	2,2	0,2	7,2	0,0	0,82
	Máx.	6,0	120	654	5,5	2,1	34,8	17,6	1,84
II	Media	3,2	42	232	2,3	0,6	9,3	12,6	0,88
	Mín.	1,0	13	69	1,3	0,3	2,8	0,0	0,40
	Máx.	5,5	73	396	3,2	1,7	18,0	59,5	1,40
	<i>Genotipo</i>	***	***a	***	***	***	***	***	***
	<i>Año</i>	***	***	***	***	***	***	***	***
	<i>Gen *Año</i>	***(74) ^b	***(17)	***(69)	***(0,5)	***(0,2)	***(3,4)	***(12,6)	***(0,15)
<i>Variancias</i>									
	<i>Genotípica</i>	2731	73	2407	0,1	0,01	7,8	11,2	0,01
	<i>Gen *Año</i>	1891	50	1351	0,1	0,03	5,0	23,0	0,01
	<i>Residual</i>	6073	155	2606	0,13	0,03	6,4	88,3	0,01

^a *** p<0,001.

^b valores de diferencia mínima significativa (LSD) (p<0,05).

La heredabilidad de los caracteres evaluados fue 0,58 y 0,59 para rendimiento por superficie y por planta respectivamente, 0,68 para NGP, 0,56 para TCP alrededor de floración, 0,15 para TCP_{DE} 0,69 para BE y 0,30 y 0,53 para esterilidad y prolificidad respectivamente. Las variancias utilizadas para las estimaciones de heredabilidad se encuentran detalladas en la Tabla II.1.

Usando los datos promedios por genotipo se pudo determinar que el NGP estuvo correlacionado significativa y positivamente con la BE acumulada, por lo que los genotipos y ambientes que presentaron mayor BE son los que presentaron más NGP ($r^2= 0,67$ p<0,001, n= 250; Fig. II.1B). Si los Exps. I y II son analizados por separado, los r^2 de las correlaciones son diferentes (0,25 y 0,55 p<0,001 n=125, respectivamente). A su vez, la BE estuvo

correlacionada significativamente con la TCP alrededor de floración. Esto implica que los genotipos y ambientes con mayores TCP alrededor de floración fueron los que acumularon mayor BE ($r^2= 0,48$ $p<0,001$, $n= 250$; Fig. II.1A). Si los Exps. I y II son analizados por separado, los r^2 de las correlaciones son diferentes ($0,07$ $p<0,01$ y $0,21$ $p<0,001$ $n=125$, respectivamente). A pesar de que estas relaciones son significativas, resulta claro la dispersión en ambas relaciones, lo que refleja diferencias en partición de biomasa a espiga (Fig. II.1A) y diferencias en la eficiencia de fijación de granos por unidad de BE entre genotipos (Fig. II.1B).

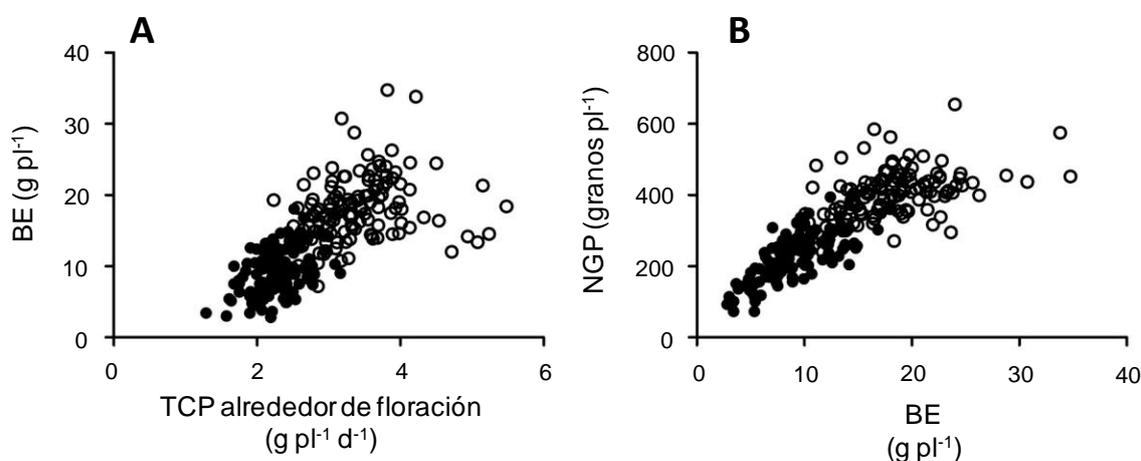


Figura II.1. Relación entre la biomasa de espigas 15 días después de floración (BE) y la tasa de crecimiento por planta (TCP) alrededor de floración (Fig. A) y relación entre el número de granos por planta (NGP) y la BE acumulada (Fig. B). Los círculos blancos corresponden al Exp. I y los negros corresponden al Exp. II.

Diferencias entre RILs para los parámetros del modelo ecofisiológico

Los parámetros de las curvas respuesta del NGP a la BE (Fig. II.1B) y de la BE a la TCP alrededor de floración (Fig. II.2A) fueron determinados para cada una de las 125 RILs evaluadas en los Exps. I y II. En la Fig. II.2 se describe a modo de ejemplo la curva de respuesta y los parámetros estimados para una RIL específica (IBM 157). Los parámetros de interés del modelo ecofisiológico evaluado son (i) el umbral de la respuesta de la BE a la TCP (TCP_b), (ii) la pendiente inicial de esta respuesta (PI_{BE}), (iii) la curvatura de esta relación a altas TCP alrededor de floración (C_{BE}), (iv) el umbral de BE para la fijación de granos (EB_b), (v) la pendiente inicial de la respuesta del NGP a la BE (PI_{NG}) y (vi) la curvatura de

esta relación (C_{NG}) (Fig. II.2). En el Apéndice A (Fig. 2), se muestran curvas de distintas RILs.

Las diferentes condiciones ambientales y de manejo empleadas en los Exps. I y II brindaron un amplio rango de TCP, permitiendo construir curvas de respuesta para cada genotipo con muy buen ajuste. El r^2 de estas relaciones fue 0,70 o mayor, y siempre fue significativo ($p < 0,001$).

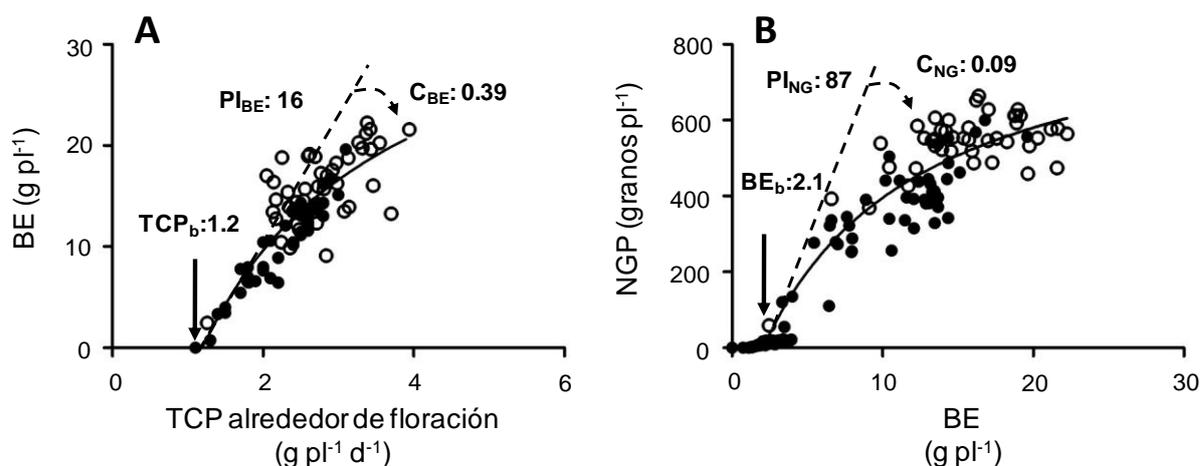


Figura II.2. Ejemplo de curvas de modelo ecofisiológico con los valores de los parámetros para una RIL (IBM157). La Fig. **A** describe la respuesta de la biomasa de espigas (BE) a la tasa de crecimiento (TCP) ($n = 90$, $r^2 = 0,74$). La Fig. **B** describe la respuesta del número de granos por planta (NGP) a BE ($n = 90$, $r^2 = 0,77$). Los parámetros del modelo son: umbral de la TCP a partir del cual hay BE (TCP_b , $g\ pl^{-1}\ d^{-1}$), pendiente inicial (PI_{BE} , $g\ g^{-1}\ d^{-1}$) y curvatura (C_{BE} , $g^{-1}\ pl\ d$) de BE vs. TCP, umbral de BE para la fijación de NGP (BE_b , $g\ pl^{-1}$), pendiente inicial (PI_{NG} , granos g^{-1}) y curvatura (C_{NG} , $g^{-1}\ pl$) para la relación de NGP vs. BE. Los círculos blancos corresponden al Exp. I y los negros corresponden al Exp. II.

La variabilidad entre las 125 RILs para estos parámetros fue amplia (Fig. II.3) y la distribución de las frecuencias siempre mostró segregación transgresiva en la mayoría de los casos. El rango máximo explorado fue de 0 a 2,1 $g\ pl^{-1}\ d^{-1}$ para TCP_b , de 3,9 a 45,8 $g\ g^{-1}\ d^{-1}$ para PI_{BE} , de 0 a 3,1 $g^{-1}\ pl\ d$ para C_{BE} , -3,3 a 6,9 $g\ pl^{-1}$ para BE_b , 21 a 152 granos g^{-1} para PI_{NG} y 0 a 0,34 $g^{-1}\ pl$ para C_{NG} (Fig. II.3). Para el único carácter que no se detectó segregación transgresiva significativa en ninguno de los extremos fue C_{NG} , donde los valores de los genotipos de los extremos no superaron a alguno de los padres más dos desvíos estándar. Para TCP_b se detectó segregación transgresiva en ambos extremos y para el resto de los parámetros sólo en el extremo superior.

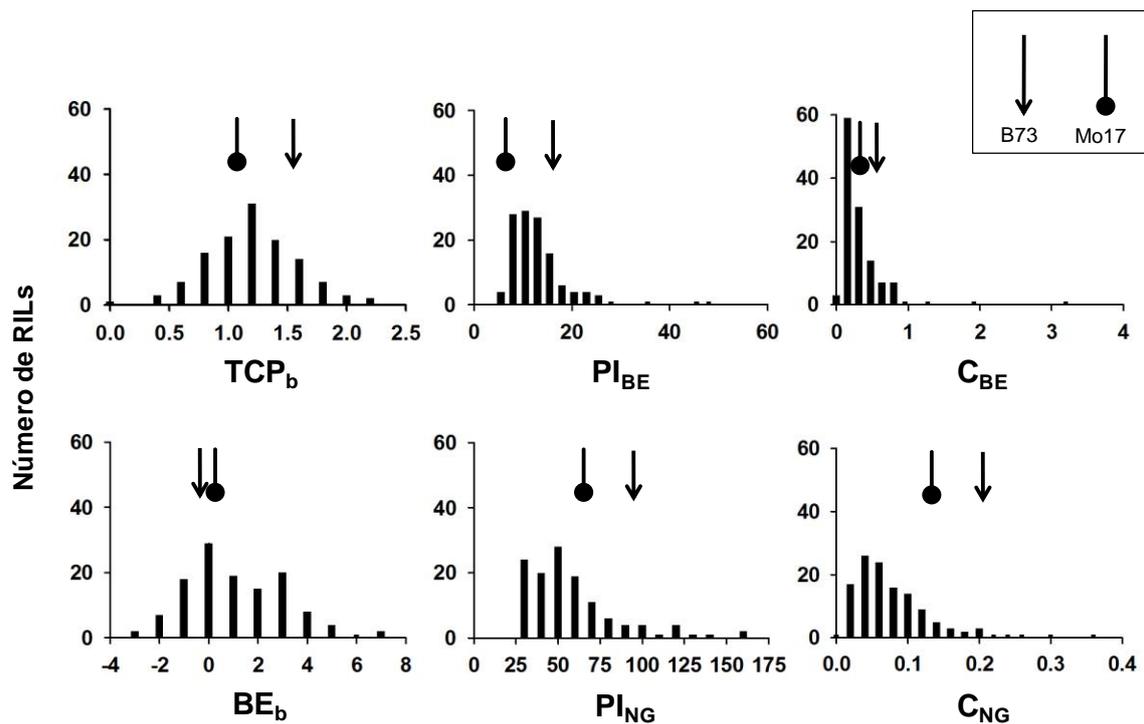


Figura II.3. Frecuencia de distribución de los parámetros del modelo ecofisiológico para las 125 RILs evaluadas de la población IBM Syn4 (B73 x Mo17). El parámetro TCP_b ($g\ pl^{-1}\ d^{-1}$) es el umbral de la tasa de crecimiento por planta (TCP) alrededor de floración a partir de cual se detecta acumulación en la biomasa de espigas (BE), PI_{BE} ($g\ g^{-1}\ d^{-1}$) es la pendiente inicial y C_{BE} ($g^{-1}\ pl\ d$) es la curvatura de la relación entre la BE y la TCP. El parámetro EB_b ($g\ pl^{-1}$) es el umbral de BE para la fijación de granos, PI_{NG} (granos g^{-1}) es la pendiente inicial y C_{NG} ($g^{-1}\ pl$) la curvatura de la relación entre el número de granos por planta y la BE (ver Figura I.2).

La heredabilidad en sentido amplio para los parámetros del modelo ecofisiológico fue 0,55 para TCP_b , 0,43 para PI_{BE} , 0,43 para C_{BE} , 0,58 para BE_b , 0,19 para PI_{NG} y 0,17 para C_{NG} .

Las correlaciones entre los parámetros del modelo ecofisiológico correspondientes a las curvas de respuesta (i.e., BE vs. TCP o NGP vs. BE) fueron significativas ($p < 0,001$; Tabla II.2). Los parámetros TCP_b , PI_{BE} y C_{BE} estuvieron positivamente correlacionados ($p < 0,001$). Además se encontraron correlaciones positivas similares para los parámetros BE_b , PI_{NG} y C_{NG} ($p < 0,001$). En el Apéndice A (Tabla 1) se muestran las correlaciones entre los BLUPs de los valores genotípicos de los parámetros del modelo ecofisiológico, BE y NGP.

Tabla II.2. Correlaciones de Pearson entre los parámetros del modelo ecofisiológico. El parámetro TCP_b ($g\ pl^{-1}\ d^{-1}$) es el umbral de tasa de crecimiento por planta (TCP) a partir del cual se detecta biomasa de espiga (BE), PI_{BE} ($g\ g^{-1}\ d^{-1}$) es la pendiente inicial y C_{BE} ($g^{-1}\ pl\ d$) es la curvatura de la relación de BE vs. TCP. El parámetro BE_b ($g\ pl^{-1}$) es el umbral de BE para la fijación de granos, PI_{NG} (granos g^{-1}) es la pendiente inicial y C_{NG} ($g^{-1}\ pl$) la curvatura de la relación de NGP vs. BE (para más detalles ver Fig. II.1).

	TCP_b	PI_{BE}	C_{BE}	BE_b	PI_{NG}
PI_{BE}	-0,51*** ^a	-	-	-	-
C_{BE}	0,44***	-0,85***	-	-	-
BE_b	ns	ns	ns	-	-
PI_{NG}	ns	ns	ns	-0,61***	-
C_{NG}	ns	ns	ns	0,53***	-0,95***

^ans: no significativo ($p>0,05$); *** $p<0,001$.

Diferencias genotípicas en porcentaje de esterilidad

A partir de los parámetros del modelo se pueden explicar diferencias en otros caracteres que no están directamente comprendidos en el modelo ecofisiológico planteado. Las diferencias entre los genotipos evaluados en el porcentaje de plantas estériles en condiciones de crecimiento de alto estrés (o bajas TCP) puede estar basado en tres mecanismos. Un mecanismo que permitiría tener bajos niveles de esterilidad es un bajo umbral de crecimiento que permita fijar granos a bajas TCP (i.e., bajos valores de TCP_b). Otro mecanismo es mantener altas TCP en ambientes pobres. Este último mecanismo también está influenciado por el coeficiente de variación de la TCP de cada parcela. Un tercer mecanismo es tener bajos coeficientes de variación entre plantas en su tasa de crecimiento, lo que permite tener canopeos más uniformes y con menos plantas creciendo por debajo del umbral (o TCP_b). Para analizar este punto se utilizaron los datos del Exp. II, ya que durante el Exp. I las condiciones de crecimiento casi no mostraron valores de esterilidad de planta (Tabla II.1).

El porcentaje de esterilidad estuvo relacionado en mayor medida con el coeficiente de variación de la TCP ($r= 0,35$, $p<0,001$, $n= 125$) y con el umbral de TCP para acumular BE (TCP_b , $r= 0,37$, $p<0,001$, $n= 125$). La relación entre porcentaje de esterilidad y la TCP

promedio fue significativa aunque de muy bajo ajuste ($r = -0,22$, $p < 0,05$, $n = 125$). Lo mismo puede observarse en el *biplot* de la Fig. II.4, que muestra el resultado del análisis de componentes principales para todas las variables de interés. Se muestran los componentes 1 y 2, que explican en conjunto el 70 % de la variación de los datos. Se observa que la esterilidad está asociada al coeficiente de variación de la TCP y a la TCP_b , y que no muestra relación con la TCP promedio alrededor de floración. En el Apéndice A, Tabla 2 se encuentran detalladas las correlaciones genéticas entre TCP, TCP_{cv} , TCP_b , porcentaje de esterilidad NGP y BE.

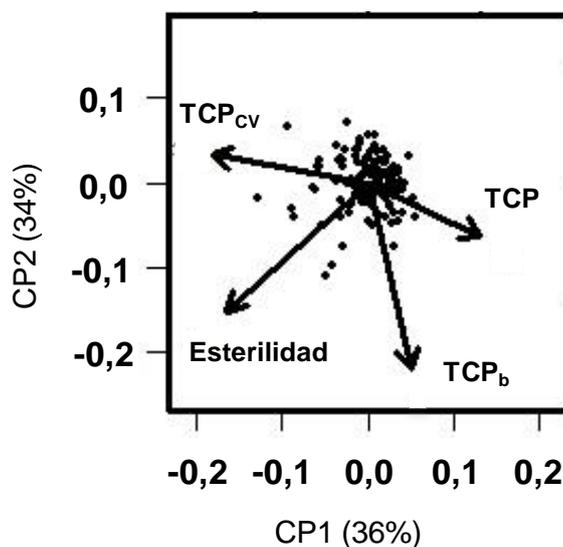


Figura II.4. Biplot del primer y segundo componente principal (CP). Los puntos corresponden a los datos de los 125 genotipos en el Exp. II. Las variables son esterilidad, tasa de crecimiento por plantas (TCP) alrededor de floración, el umbral de la TCP para la acumulación de biomasa en espiga (TCP_b) y el coeficiente de variación de la TCP (TCP_{cv}).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se evaluó la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17) para rendimiento, NGP, BE acumulada al final del período de floración y TCP alrededor de floración y otros caracteres relacionados con partición de biomasa y eficiencia de fijación de granos por unidad de biomasa de espiga. Las líneas parentales de la población de RILs IBM Syn4 (B73 y Mo17) fueron referentes para el mejoramiento (Troyer, 1999) y a partir de estas líneas se originó gran parte de germoplasma comercial actual (Mikel y Dudley, 2006). Esta población se ha convertido en una población de referencia en diferentes estudios académicos y privados (www.maizegdb.org) y es de especial interés ya que B73 fue secuenciada y utilizada para una gran cantidad de estudios (Schnable et al., 2009). La población había sido previamente descrita para caracteres como NGP y tamaño de espiga pero no existía información sobre los parámetros del modelo ecofisiológico evaluado (Abertondo, 2007). Los parámetros del modelo habían sido descriptos solamente para los dos parentales (Borrás et al., 2009; Severini et al., 2011).

La metodología de muestreo utilizada para caracterizar la población de RILs ha sido ampliamente aplicada en una gran cantidad de estudios para caracterizar híbridos comerciales y líneas endocriadas (Vega et al., 2000; Borrás y Otegui, 2001; Maddonni y Otegui, 2004; D'Andrea et al., 2006; Echarte y Tollenaar, 2006, Pagano y Maddonni, 2007; D'Andrea et al., 2008; Gambín et al., 2008; Borrás et al., 2009; D'Andrea et al., 2009; Rossini et al., 2011; Rattalino Edreira y Otegui, 2012). Para el estudio de los caracteres evaluados en esta tesis es necesario realizar las mediciones a nivel de planta. Esto está relacionado con la relación curvilínea existente entre la TCP alrededor de floración y el NGP establecido, que implica que canopeos con misma TCP media pero diferente variación tendrán distinto número de granos por superficie. Los modelos alométricos permiten evaluar los caracteres a nivel de planta, y aumentan el nivel de detalle con respecto a evaluaciones a nivel de canopeo. El uso de protocolos estandarizados es fundamental para llevar a cabo este tipo de mediciones en una elevada cantidad de genotipos. La información fenotípica generada mostró la importancia de realizar este tipo de mediciones para estudiar el número granos y su fijación con respecto al crecimiento a nivel de plantas. Un ejemplo es la Fig. II.2, realizada con los datos de todas las plantas evaluadas en cada uno de los ambientes, para un genotipo determinado.

Originalmente el modelo ecofisiológico propuesto explicaba las variaciones genéticas y ambientales en el NGP con la TCP alrededor de floración (Edmeades y Daynard, 1979;

Tolleenaar et al., 1992; Otegui y Bonhomme, 1998). Posteriormente se comenzó a analizar la determinación del NGP como dos procesos diferentes (Andrade et al., 1999; Echarte et al., 2004; Borrás et al., 2007; Pagano y Maddonni, 2007; D'Andrea et al., 2008). El primero es la relación entre NGP y la BE, y el segundo es la relación entre la BE y la TCP alrededor de floración. La primera relación es usualmente identificada como la eficiencia de fijación de granos por unidad de biomasa reproductiva acumulada y la segunda representa la partición de biomasa a la estructura reproductiva (Vega et al., 2001). Los parámetros de cada uno de los dos procesos no mostraron correlaciones significativas entre sí (Tabla II.2), lo que refuerza la idea de que están controlados por mecanismos fisiológicos distintos.

La caracterización realizada sobre la población de RILs puede ser comparada con estudios previos que utilizaron el mismo modelo ecofisiológico para describir genotipos diversos. Echarte y Tollenaar (2006) describieron la relación entre la BE y la TCP alrededor de floración para dos híbridos simples y sus líneas parentales. El valor del umbral de la TCP para acumular BE (TCP_b) para los híbridos y para una de las líneas parentales fue significativamente menor que el resto de los genotipos. En la población de RILs evaluada en la presente tesis se encontraron valores máximos similares y valores aún menores a los reportados para los genotipos analizados por Echarte y Tollenaar (2006) (Fig. II.3).

Borrás et al. (2007) desarrollaron un marco teórico para cuantificar la dinámica de la floración femenina en maíz a nivel de canopeo analizado como un proceso de crecimiento de la espiga con el modelo ecofisiológico aplicado en la presente tesis. Borrás et al. (2007) reportan valores del umbral de la TCP para la acumulación de BE para dos híbridos comerciales. Estos valores (i.e., 0,86 y 1,34 g $pl^{-1} d^{-1}$) son cercanos a la media de la población de RILs evaluados en esta tesis (1,1 g $pl^{-1} d^{-1}$). Posteriormente Borrás et al. (2009) evaluaron simulaciones del tiempo desde antesis hasta aparición de estigmas. Para ello evaluaron genotipos diversos (líneas e híbridos) en ambientes contrastantes y describieron los parámetros del modelo ecofisiológico que relaciona la BE y la TCP alrededor de floración (TCP_b , PI_{BE} y C_{BE}). En general los híbridos presentaron mayores TCP que las líneas, y el rango de TCP alrededor de floración explorado fue similar al descrito en la presente tesis (Tabla II.1). Los autores encontraron diferencias significativas entre los genotipos para los tres parámetros del modelo mencionados, pero no se observan diferencias entre líneas e híbridos. Entre los genotipos evaluados estaban las líneas parentales de la población de RILs empleada en este estudio (B73 y Mo17). Tanto en los resultados de Borrás et al. (2009) como en la presente tesis, B73 presentó un umbral para la acumulación de BE (TCP_b) ligeramente mayor, mayor pendiente inicial (PI_{BE}) y mayor curvatura (C_{BE}) de la relación entre BE y TCP con respecto a Mo17 (Fig. II.2).

Recientemente los parámetros del modelo ecofisiológico fueron descriptos para híbridos comerciales actuales de la Argentina (Hernández et al., 2014). El umbral de TCP para la acumulación de BE (TCP_b) fue en general menor al encontrado en la población de RILs evaluadas en la presente tesis. El resto de los parámetros presentaron medias similares. A diferencia de Hernández et al. (2014) en la presente tesis se incluyó un umbral de BE acumulada (BE_b) para la fijación de granos en la relación de NGP y BE, ya que las RILs evaluadas de la IBM Syn4 tenían variabilidad en este parámetro del modelo.

La caracterización de los parámetros del modelo ecofisiológico permite entender que entre los genotipos existen importantes diferencias en cuanto a partición de biomasa hacia las estructuras reproductivas y en eficiencia de fijación de granos. Los valores de heredabilidad son de utilidad para indicar el potencial que tiene cada uno de los parámetros para ser mejorados por selección. Sin embargo, a pesar de las diferencias genotípicas, al analizar todos los genotipos en los dos ambientes evaluados los genotipos y ambientes que mostraron mayores valores de NGP son los que tuvieron acumulaciones de BE mayores (Fig. II.1B, $r^2= 0,67$; $p<0,001$; $n= 250$). Además, existió una correlación positiva entre acumulación de BE y TCP (Fig. II.1A, $r^2= 0,48$, $p<0,001$; $n= 250$). Esto implica que los genotipos y ambientes que tienen mayores TCP son los que fijan mayor NGP (Fig. II.1).

El incremento del rendimiento en los híbridos comerciales está relacionado al porcentaje de esterilidad en las plantas. Existen numerosos reportes que indican que los híbridos más viejos poseen mayor porcentaje de esterilidad que los más modernos, principalmente a altas densidades (Russel, 1991; Duvick, 2005; Campos et al., 2004). Tollenaar et al. (1992) comparó nueve híbridos comerciales liberados en diferentes décadas y determinó que el menor porcentaje de esterilidad de los híbridos más recientes estaba relacionado a una mayor TCP alrededor de floración y no a la mayor capacidad de producir espigas con granos a bajas TCP alrededor de floración. Hernández et al. (2014), al evaluar híbridos comerciales actuales, encontraron que las diferencias genotípicas para esterilidad son el resultado de diferencias en la TCP en condiciones de estrés, al umbral a partir del cual hay acumulación de BE (TCP_b) y a la variabilidad en el crecimiento de plantas dentro del canopeo. Para la población de RILs evaluada en esta tesis la esterilidad estuvo relacionada positivamente al umbral para la acumulación de BE (TCP_b) y al coeficiente de variación de la TCP alrededor de floración, y negativamente a la TCP media alrededor de floración. Estos resultados demuestran que estos tres parámetros son importantes para explicar las variaciones en el porcentaje de esterilidad.

CONCLUSIONES

Se caracterizaron 125 líneas de la población de RILs IBM Syn4 B73 x Mo17 para rendimiento, NGP, BE, esterilidad, prolificidad, TCP alrededor de floración y su desvío estándar en dos ambientes contrastantes. Estos datos han permitido confirmar la dependencia del NGP a la BE acumulada al final del período de floración. A su vez, se confirmó la relación de la BE con la TCP alrededor de floración.

Se construyeron curvas específicas para cada una de las RILs evaluadas para la relación de NGP con BE acumulada y con la TCP alrededor de floración, que permitieron determinar los parámetros del modelo específicos de cada genotipo. Estos parámetros, mostraron una amplia variación en la población de RILs evaluada. Se encontraron correlaciones entre los parámetros del modelo dentro de cada una de las relaciones evaluadas (i.e., BE vs. TCP que representa la partición de biomasa hacia estructuras reproductivas o NGP vs. BE que representa la eficiencia de fijación de granos). A su vez, los parámetros de cada una de las relaciones mostraron ser independientes entre sí.

En general se encontró una importante variabilidad entre RILs de la población IBM Syn4 para todas las variables evaluadas. Estos datos son el primer paso para un análisis de las bases genéticas de la determinación del número de granos en maíz.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE QTL Y PREDICCIÓN DE NÚMERO DE GRANOS

INTRODUCCIÓN

El rendimiento de maíz está determinado por el número de granos por superficie y el peso promedio de estos. Ambos caracteres son componentes del rendimiento importantes, pero el número de granos es responsable por la mayor parte de la variación del rendimiento (Early et al., 1967; Otegui, 1995; Chapman y Edmeades, 1999). Se reconoce que entender y predecir el número de granos por planta o por superficie para diferentes genotipos y ambientes es importante para guiar el mejoramiento del maíz o el manejo del cultivo para incrementar el rendimiento. La importancia y correlación entre rendimiento y número de granos se pudo corroborar al estudiar población IBM Syn4 (B73 x Mo17) en el Capítulo II de la presente tesis.

Como se describió en el Capítulo I, el NGP es un carácter cuantitativo. Los caracteres cuantitativos son controlados por un gran número de genes y son altamente influenciados por el ambiente. Las regiones cromosómicas que controlan los caracteres cuantitativos son comúnmente referidas como QTL, y es posible localizar un QTL en el genoma y estimar su efecto asociando el carácter de interés con marcadores moleculares de ADN (Tanksley, 1993). Existen evidencias previas de detección de QTL para NGP en maíz (e.g. Beavis et al., 1994a, Ribaut et al., 1997; Agrama et al., 1999; Frova et al., 1999; Peng et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de los resultados de estos estudios no fueron consistentes al ser evaluados en distintos ambientes. Bernardo (2008) considera que las interacciones genotipo x ambiente son la principal causa de las discrepancias en los resultados de los estudios de QTL para caracteres complejos. Por otra parte, esta falta de consistencia puede estar relacionada con la necesidad de analizar caracteres complejos en caracteres más simples (Slafer, 2003). Una forma de analizar el carácter NGP es a través de un modelo ecofisiológico que relaciona el NGP y la BE con la TCP alrededor de floración.

A pesar de la gran cantidad de trabajos donde se detectan QTL para caracteres complejos como el NGP en maíz, todavía son limitados los trabajos que buscan QTL para procesos fisiológicos que puedan escalar a mayores niveles de organización teniendo en cuenta el ambiente de crecimiento (Hammer et al., 2006). El estudio de caracteres asociados a la fijación del número de granos es importante producto de su relevancia para la

predicción y entendimiento del rendimiento en el cultivo de maíz en distintos escenarios ambientales.

Una posible solución para resolver las interacciones genotipo x ambiente es usar modelos inspirados en procesos fisiológicos (Hammer et al., 2006). Estos modelos son ecuaciones con parámetros específicos que describen la respuesta del carácter al ambiente. Los modelos de respuesta varían para diferentes genotipos, por lo que los parámetros de las ecuaciones son específicos de cada genotipo. Estos parámetros permiten conectar el ambiente con el carácter final. Reymond et al. (2003) determinaron las bases genéticas (QTL) de los parámetros de las curvas de respuesta del rasgo de interés (tasa de elongación foliar) al ambiente y estimaron el carácter con el efecto de los QTL de cada parámetro e información ambiental. Ejemplos de este enfoque fueron reportados para crecimiento de hojas en arroz (Wu et al., 2002), elongación de hojas en maíz (Reymond et al., 2003), tiempo a floración en cebada (Yin et al., 2005) y tolerancia a sequía en maíz (Messina et al., 2011).

Una importante característica de utilizar este tipo de aproximaciones es que con un modelo de simulación apropiado, podemos predecir el fenotipo a partir del genotipo teniendo en cuenta la gran variabilidad de escenarios posibles según las combinaciones de genotipo x ambiente x manejo. Esto es relevante para el mejoramiento, ya que tenemos que considerar que los mejoradores son capaces de explorar una parte limitada de la gran cantidad de combinaciones en sus programas de testeo (Hammer y Jordan, 2007). Además, este tipo de aproximaciones permiten estudiar la variabilidad que puede encontrarse en un carácter combinando atributos de los distintos genotipos (Messina et al., 2011, Chenu et al., 2009, Yin et al., 2004).

En el Capítulo III de la tesis se estudiaron las bases genéticas de la determinación de NGP en maíz con dos enfoques diferentes. Primero con un análisis de QTL en los caracteres finales *per se* (NGP y BE) y segundo con un análisis de QTL sobre los parámetros de las curvas del modelo ecofisiológico planteado que describe la respuesta del NGP y la BE a la TCP alrededor de floración (Fig. I.2). El primer enfoque representa la forma tradicional de analizar los caracteres cuantitativos, que es realizar el análisis genético a partir de los datos del carácter de interés directamente. El segundo enfoque está basado en un marco fisiológico similar al que fue recientemente incorporado en simulaciones de programas de mejoramiento comerciales actuales (Messina et al., 2011). Se realizaron ambos enfoques con el fin de comparar el valor del segundo enfoque con respecto al enfoque tradicional. Con la información genética obtenida en el análisis de QTL se propuso predecir el NGP y la BE.

Se utilizó la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17) con los datos fenotípicos descriptos en el Capítulo II, y se llevó a cabo el análisis de QTL con los dos ambientes de crecimiento descriptos en el Capítulo II. La información obtenida en cada uno de los enfoques se utilizó para predecir el NGP y la BE en otros experimentos en diversos ambientes de crecimiento.

Objetivos específicos

- Realizar un análisis genético (QTL) sobre NGP y BE *per se* y sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que relaciona NGP, BE y TCP durante el período de floración.
- Utilizar la información genotípica (QTL) para predecir NGP y BE a partir de dos enfoques diferentes:
 - Análisis de QTL sobre los caracteres BE y NGP *per se*.
 - Análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que relacionan NGP, BE y TCP durante el período de floración.

Hipótesis específicas

- Existen QTL asociados con los caracteres NGP y BE *per se* y con los parámetros del modelo ecofisiológico para la relación entre NGP, BE y TCP durante el período de floración.
- Las regiones cromosómicas (o QTL) asociadas a los parámetros ecofisiológicos de la determinación del NGP son diferentes a las regiones asociadas con los caracteres NGP y BE *per se*.
- La información de un análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que describe la respuesta de NGP a diferentes condiciones de crecimiento de planta mejora la capacidad de predicción de NGP y BE en diferentes condiciones ambientales respecto a predicciones a partir de información de un análisis de QTL sobre NGP y BE *per se*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el Capítulo II se describe la caracterización fenotípica de la población de RILs IBM Syn4. Los datos fenotípicos descriptos fueron utilizados en el presente Capítulo III para el estudio genético.

Construcción del mapa genético

Los datos de los marcadores de ADN utilizados para construir el mapa de ligamiento fueron obtenidos de la página web de Maize GDB (www.maizegdb.org). Se encuentran disponibles distintos tipos de marcadores moleculares. Antes del análisis de ligamiento, se aplicó la prueba de Chi cuadrado para verificar la segregación mendeliana 1:1 para cada marcador molecular (Kearsey y Pooni, 1996). Los marcadores que mostraban una segregación distorsionada fueron descartados del análisis. A partir de los marcadores que mostraban la segregación mendeliana esperada, se seleccionaron aproximadamente cuatro marcadores por bin (de acuerdo al mapa consenso de la población IBM Syn4) para construir un mapa de ligamiento preliminar. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de QTL para detectar los marcadores de los intervalos asociados a cada carácter. El mapa de ligamiento preliminar fue construido con 362 marcadores moleculares. Posteriormente, se agregaron todos los marcadores disponibles alrededor de los QTL detectados. Un total de 513 marcadores de ADN del mapa consenso de IBM Syn4 fueron utilizados para el mapa de ligamiento final. El análisis de ligamiento fue llevado a cabo utilizando MapDisto V1.7 (Lorieux, 2007). Las distancias del mapa fueron calculadas con la función de mapeo de Haldane (Haldane, 1919). Se utilizó un mapa común para todos los caracteres.

Análisis de QTL

El análisis genético se realizó sobre los caracteres finales *per se* (NGP y BE) y sobre los parámetros del modelo ecofisiológico (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , BE_b , PI_{NG} y C_{NG}). Para ello, se utilizaron los datos de las 125 en común de los Exps. I y II, descriptas en el Capítulo II.

Para el análisis fenotípico de NGP y BE se usó un modelo mixto multi-carácter multi-ambiente siguiendo los procedimientos descriptos en Malosetti et al. (2008) y Alvarez Prado

et al. (2013). El modelo consideró a los genotipos como efectos aleatorios, con distribución normal y estructura de variancia y covariancia particular. La elección del mejor modelo para los datos se basó en el criterio de información Bayesiana (BIC) (Schwarz, 1978). Para este conjunto de datos, el mejor modelo de variancia-covariancia fue el de “simetría compuesta”. Se estimaron los mejores predictores lineales insesgados (BLUP) de cada parámetro para cada genotipo. Las estimaciones se realizaron con SAS[®] PROC MIXED (SAS Institute, 1999).

Se obtuvo un valor por genotipo de cada uno de los parámetros del modelo ecofisiológico (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , BE_b , PI_{NG} y C_{NG}) ajustando los modelos descritos en el Capítulo II (Ecs. [1] - [4]). Los parámetros que no poseían una distribución normal fueron transformados (Lübberstedt et al., 1998; Fiedler et al., 2012). Para este análisis se utilizó el test modificado de Shapiro y Wilk (Rahman y Govindarajulu, 1997) con InfoStat v2013 (DiRienzo et al., 2013). Este fue el caso para PI_{BE} , C_{BE} , PI_{NG} y C_{NG} . Los parámetros PI_{BE} y PI_{NG} fueron transformados con $\sqrt{1/(1+x)}$ mientras que C_{BE} y C_{NG} fueron transformados con el arco seno de $(1/1+x)$.

El análisis de mapeo de QTL fue realizado con WinQTL Cartographer V2.5 (Wang et al., 2010). Se siguió un procedimiento dividido en dos pasos. Primero, con el mapa de ligamiento final se realizó un procedimiento de mapeo multi-caracter, que considera correlaciones entre los caracteres. Se utilizó el método de mapeo por intervalos compuestos (CIM), con un análisis de regresión *stepwise* (Modelo 6 de WinQTL Cartographer V2.5; Wang et al., 2010). Se usó un umbral de 0,05 para seleccionar el ingreso y egreso de posibles QTL para usarlos como cofactores para controlar el fondo genético. Se utilizó una ventana de 10 cM para remover temporalmente el efecto de los marcadores que se encontraban dentro de esa ventana durante el escaneo del genoma. Los intervalos de escaneo entre el marcador y QTL supuesto fueron de 1 cM. La posición más probable del QTL fue asignada a los puntos donde el valor de LOD era máximo.

Las posiciones de los QTL detectados en el primer paso fueron consideradas como QTL candidatos y constituyeron el modelo inicial para el segundo paso. En este segundo paso, se construyó un modelo multi-QTL usando el procedimiento de mapeo de múltiples caracteres en múltiples intervalos (MIM). Partiendo de un modelo inicial, el procedimiento estimó los parámetros del modelo, refinó las posiciones de los QTL dentro del intervalo, testeó la significancia de todos los parámetros para caracteres individuales y buscó nuevos QTL y finalmente calculó la variancia genética explicada por el modelo (Basten et al., 2004). Se utilizó un procedimiento de selección *stepwise* y el modelo final se seleccionó de una secuencia de test anidados (Basten et al., 2004). Cada vez que el modelo fue refinado se

realizó la prueba del cociente de la verosimilitud (Ec. [6]) para determinar si el cambio en el modelo era significativo (Kao, 1999):

$$PCV = 2(\log L_1 - \log L_0) \quad [6]$$

donde PCV es la prueba del cociente de la verosimilitud, y L_1 y L_0 son la verosimilitud del modelo refinado y el modelo original, respectivamente. La diferencia entre los logaritmos de la verosimilitud fue multiplicada por dos para generar una distribución chi-cuadrado. Luego, se probó la significancia usando el estadístico chi-cuadrado. Los grados de libertad para la prueba eran iguales a la diferencia entre el número de parámetros entre los modelos final e inicial.

El mapeo por intervalos múltiples (MIM) usa simultáneamente múltiples intervalos de marcadores para insertar directamente múltiples QTL posibles en el modelo, resultando más potente y preciso. La variancia genética en el modelo utilizado para MIM no sólo está determinada por el efecto aditivo de cada QTL individual sino también por la covariancia genética entre los QTL del modelo. Al tratarse de un modelo de múltiples QTL se informa un r^2 general para cada carácter y no individualmente para cada QTL (Kao, 1999).

El umbral para declarar la presencia de un QTL significativo fue de LOD= 2,5 (Van Ooijen, 1999). Los efectos aditivos de los caracteres transformados fueron estimados con datos sin transformar. Sólo los caracteres correlacionados fueron agrupados y analizados en conjunto.

A pesar de que varios autores consideran que la epistasis posee una contribución importante sobre los caracteres cuantitativos en maíz (Blanc et al., 2006; Dudley y Johnson, 2009; Gonzalo et al., 2010), la misma no fue estimada en la presente tesis. Se considera que la población tiene bajo poder de detectar epistasis ya que debido a tener genotipos homocigotas no pueden evaluarse gran parte de las posibles combinaciones y el número de individuos para testear cada una de las interacciones es muy bajo (Zhang et al., 2012).

Predicción de BE y NGP

A partir de la información genética obtenida con los análisis de QTL se estimó la BE y el NGP. Las predicciones se compararon con datos observados de genotipos diferentes a los utilizados para el análisis de QTL y en diferentes ambientes. Para ello se realizaron experimentos que son descriptos a continuación.

Diseño experimental y experimentos a campo

Se llevaron a cabo cinco Exps. (Tabla III.1). Los Exps. III, IV y VI se localizaron en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Argentina (33°01S, 60°52O). El Exp. VI se localizó en la Estación Experimental INTA Pergamino, Argentina (33°56S, 60°33O) y el Exp. VII en Brunner Farm, Iowa State University, Estados Unidos (42°2N, 96°39O).

Los Exps. III y IV fueron sembrados el 14 de Septiembre de 2009 y el 4 de Octubre de 2010, respectivamente. En el Exp. III se evaluaron 42 RILs y los padres de IBM Syn4 y 113 RILs más los padres en el Exp. II. Ninguno de estos genotipos fue coincidente con las 125 RILs evaluadas en los Exps. I y II (Capítulo II). Los Exps. V y VI fueron sembrados el 17 de Octubre de 2011 y el 15 de Septiembre de 2009, respectivamente e incluyeron algunos genotipos coincidentes con las 125 RILs y otros diferentes. El Exp. VII fue sembrado el 11 de Mayo y sólo incluyó los padres de la población (Tabla III.1).

Tabla III.1. Descripción general de los experimentos.

Exp.	Localidad	Fecha de siembra	Número de genotipos	Densidad pl m ⁻²
III	Zavalla	14 Sept. 2009	42 + parentales	5
IV	Zavalla	4 Oct. 2010	113+ parentales	7,5
V	Zavalla	17 Oct. 2011	11 + parentales	4 y 10
VI	Pergamino	15 Sept. 2009	8 + parentales	3 y 12
VII	Iowa	11 Mayo 2007	parentales	3 y 9

El diseño utilizado fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones excepto en el Exp. VII, que se usó un diseño de parcelas divididas con densidad como parcela principal y genotipos como sub-parcelas. Las parcelas fueron sembradas con una densidad mayor a la objetivo y raleadas en V2-V3. En los Exps. V, VI y VII se utilizaron tratamientos de distintas densidades de plantas para todos los genotipos (Tabla III.1). La densidad de plantas fue de 4 y 10 pl m⁻² en el Exp. V, 3 y 12 pl m⁻² en el Exp. VI y 3 y 9 pl m⁻² en el Exp. VII. En los Exps. III y IV las parcelas fueron de cuatro surcos a 0,70 m y 5,5 m de largo. En el Exp. V los surcos fueron 5,5 m de largo distanciados a 0,52 m. En el Exp. VI los surcos fueron de 7 m distanciados a 0,7 m. En el Exp. VII cada parcela consistió de seis (alta densidad) u ocho (baja densidad) surcos de 5,5 m de largo distanciados a 0,76 m. Los

detalles del Exp. VII fueron descritos en Severini et al. (2011). En el Exp. V se aplicó fertilizante cuatro a cinco días antes de la siembra a una dosis de 100 kg ha⁻¹ de N y 80 kg ha⁻¹ de S. A la siembra se incorporaron 18 kg ha⁻¹ de N y 83 kg ha⁻¹ de P. En el Exp. VI el fertilizante fue aplicado antes de la siembra a una dosis de 110 kg ha⁻¹ de N.

Los ensayos fueron mantenidos libres de malezas e insectos. Los experimentos fueron conducidos sin limitaciones hídricas visibles. El Exp. V fue regado con un sistema de riego por aspersión durante floración y principio de llenado de granos con 150 mm. En los demás experimentos no fue necesario regar ya que ocurrieron lluvias a lo largo del cultivo y no se manifestaron signos visibles de estrés hídrico.

Mediciones fenotípicas

La TCP alrededor de floración, la BE y el NGP fueron determinados en 15 plantas por repetición en los Exps. III a VI y 30 plantas por repetición en el Exp. VII. La estimación de la TCP, la BE y el NGP se realizó mediante modelos alométricos como los descritos en el Capítulo II. Los valores de r^2 para el modelo alométrico en pre-floración estuvieron en un rango entre 0,69 a 0,98 ($p < 0,001$, $n = 9$ en los Exps. III a VI y $n = 18$ en el Exp. VII) para todos los genotipos y años. Los valores de r^2 para los modelos post-floración estuvieron en un rango entre 0,51 a 0,99 ($p < 0,001$, $n = 9$ en los Exps. III a VI y $n = 18$ en el Exp. VII). Los modelos alométricos para estimar la BE estuvieron en un rango entre 0,54 a 0,99 ($p < 0,001$, $n = 9$ en los Exps. III a VII y $n = 18$ en el Exp. VII).

La variabilidad planta a planta en la TCP alrededor de floración fue determinada para cada parcela (TCP_{DE}).

Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la variabilidad individual de cada caracter, se utilizó un modelo lineal generalizado para cada caracter individualmente. Para este análisis se utilizó PROC GLM de SAS® (SAS Institute, 1999). Cada uno de los Exp. fue analizado por separado. Los modelos incluyeron repeticiones, genotipos, y en los Exps. V, VI y VII la densidad de plantas y la interacción genotipo x densidad. Las medias individuales fueron comparadas con un test de diferencia mínima significativa (LSD).

Pasos para la predicción de BE y NGP

La BE y el NGP fueron estimados para el conjunto de experimentos descrito (Exps. III a VII; Tabla III.1) utilizando información genética obtenida de los análisis de QTL de los datos fenotípicos de los experimentos mencionados en el Capítulo II (Exps. I y II). Las estimaciones fueron realizadas siguiendo dos procedimientos diferentes. El primero usó información de QTL de los caracteres *per se* (BE y NGP), y la segunda usó información de los QTL de los parámetros del modelo ecofisiológico (TCP_b, PI_{BE}, C_{BE}, BE_b, PI_{NG} y C_{NG}).

El valor fenotípico de cada carácter fue estimado utilizando el siguiente modelo genotípico. Asumiendo que dos QTL fueron detectados para el carácter de interés, el modelo genético para dicho carácter es:

$$\gamma_k = \mu + a_i x_{Aik} + a_j x_{Ajk} \quad [7]$$

donde γ es el valor fenotípico de un carácter en el genotipo k ($k = 1, 2, \dots, n$); μ es la media del carácter de los 125 genotipos; a_i y a_j son los efectos aditivos de los QTL supuestos (Q_i y Q_j respectivamente); x_{Aik} y x_{Ajk} son los coeficientes de los efectos de los QTL derivados de acuerdo a los genotipos de los marcadores flanqueantes y las posiciones resultantes del análisis.

Para el primer tipo de predicciones, γ_k del modelo [7] representa la BE o el NGP para el genotipo k , y ambos fueron determinados directamente basados en los QTL detectados del análisis genético sobre los caracteres *per se*.

Para el segundo enfoque, γ_k del modelo [7] representa cada parámetro del modelo ecofisiológico para el genotipo k (TCP_b, PI_{BE}, C_{BE}, BE_b, PI_{NG} y C_{NG}). El valor de cada parámetro fue determinado en base a los QTL detectados del análisis genético realizado para los parámetros del modelo. Una vez que fueron estimados los valores de los parámetros para cada genotipo, fue posible construir las curvas de respuesta de la BE a la TCP alrededor de floración y del NGP a la BE para cada genotipo específico. En este enfoque, para estimar la BE y el NGP se requiere información de la TCP alrededor de floración en el ambiente del que se quiere realizar la predicción. A partir de medias corregidas de TCP_{50%} y TCP_{DE} de cada combinación de experimento x genotipo x densidad (SAS® PROC GLM, SAS Institute, 1999) se realizaron estimaciones siguiendo los siguientes pasos:

- I. La variabilidad en TCP para cada combinación de experimento x genotipo x densidad fue dividida en 100 fracciones iguales. El valor asignado de TCP a cada fracción se calculó a partir de $TCP_{50\%}$ y TCP_{SD} de cada combinación de tratamientos, asumiendo una distribución normal de la TCP (la TCP mostró una distribución normal en todos los experimentos; Fig. III.1A). Los modelos alométricos utilizados para estimar la TCP brindaron una variabilidad planta a planta para cada combinación.
- II. Calcular la BE acumulada 15 días después de 50% de anthesis estimada para cada fracción. Esto está basado en la curva de respuesta de la BE vs. la TCP controlada por los parámetros TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} (Fig. III.1B).
- III. Calcular el NGP para cada fracción del canopeo. Esto está basado en la curva del NGP vs. la BE controlada por los parámetros BE_b , PI_{NG} y C_{NG} (Fig. III.1C).
- IV. La BE y el NGP estimados para cada fracción fueron promediados y finalmente se determinó la BE y el NGP para cada combinación de experimento x genotipo x densidad.

Es importante entender que la necesidad de dividir la población de plantas en fracciones está basada en el concepto de que a pesar que la TCP está normalmente distribuida, la BE y el NGP no poseen la misma distribución (Borrás et al., 2007).

Por último, para poder discernir si las diferencias entre las predicciones de los distintos enfoques se deben a la información genética o la incorporación de información del ambiente, se evaluó el enfoque que emplea el modelo ecofisiológico usando solamente un valor promedio de todas las RILs para cada parámetro del modelo (i.e., sin considerar la información de los QTL) y los valores específicos de cada RIL para $TCP_{50\%}$ y TCP_{DE} . El valor de cada parámetro se calculó a partir del promedio de todos los genotipos que habían sido determinados a partir de las curvas construidas a partir de los Exps. I y II (descritos en el Capítulo II). Esto fue realizado para evaluar el efecto de tener, o no, valores genotípicos específicos para cada parámetro del modelo.

La BE y el NGP predichos fueron comparados con una correlación de Pearson con las medias corregidas de BE y NGP de cada combinación de experimento x genotipo x densidad (SAS® PROC GLM, SAS Institute, 1999).

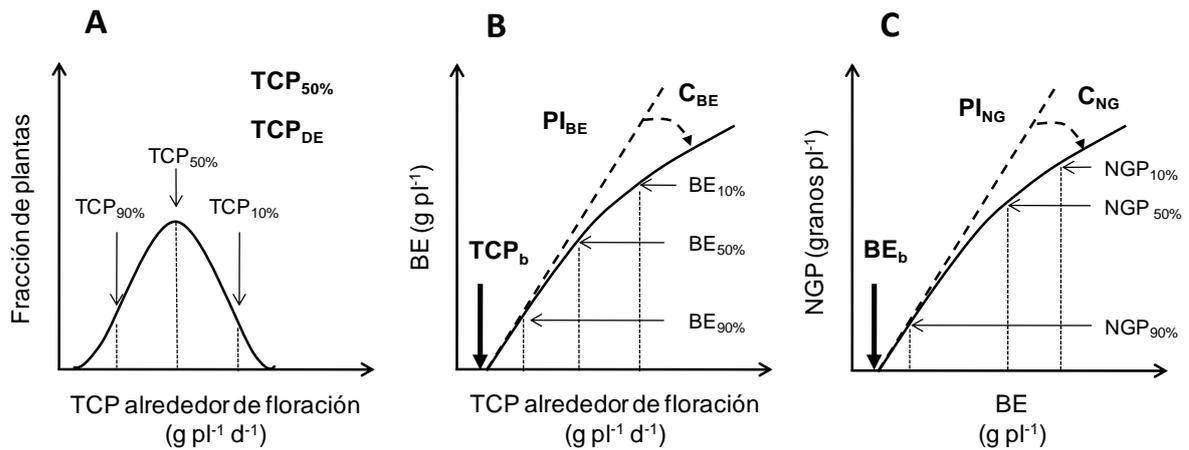


Figura III.1. Esquema con la descripción del modelo ecofisiológico para la determinación de la biomasa de espigas acumulada 15 d después del 50% de antesis (BE) y el número de granos por planta (NGP) (basado en Borrás et al., 2007). (Fig. A) La población de plantas de cada combinación de tratamientos (experimento x genotipo x densidad) es subdividida en fracciones. Se calcula una tasa de crecimiento por planta (TCP) para cada fracción de la población basado en la TCP media (TCP_{50%}) y el desvío estándar de la TCP (TCP_{DE}). Las flechas indican las fracciones de la población que tienen (TCP_{50%}), las fracciones que tienen tasas con el 10% mayor (TCP_{10%}), y con el 10% menor (TCP_{90%}). (Fig. B) La TCP determina la BE que logra cada fracción de la población. La función hiperbólica para BE (Ec. 11) y [2] del Capítulo II) está definida por el umbral de la tasa de crecimiento para acumulación de biomasa en la espiga (TCP_b), pendiente inicial (PI_{BE}) y la curvatura (C_{BE}), los cuales son genotipo-dependientes. (Fig. C) La BE determina el NGP que logra cada fracción de la población. La función hiperbólica para NGP (Eq. [3] y [4] del Capítulo II) está definida por el umbral de la BE para la fijación de granos (BE_b), pendiente inicial (PI_{NG}) y la curvatura (C_{NG}), los cuales son dependientes del genotipo. El promedio de la BE y el NGP determinado para cada fracción de la población de plantas brinda el valor promedio para cada tratamiento específico.

RESULTADOS

Análisis de QTL para BE y NGP

Primero se realizó un análisis de QTL sobre los caracteres finales *per se* (BE y NGP). Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla III.2. Se llevó a cabo un mapeo multi-caracter utilizando mapeo por intervalos compuestos (CIM), que constituyó el punto de partida para el análisis de MIM multi-caracter. El total de la variación explicada por el modelo MIM multi-caracter fue 45 y 34 % para BE y NGP, respectivamente (Tabla III.2).

La Fig. III.2 describe la localización de los QTL junto con los efectos aditivos estimados de B73 para cada caracter analizado.

Ocho QTL significativos fueron detectados para BE y cinco para NGP (Tabla III.2). En coincidencia con la correlación fenotípica ($r^2= 0,67$; $p<0,001$; $n= 250$), se encontraron correlaciones positivas entre los efectos aditivos de los QTL de BE y NGP localizados en las mismas posiciones.

Análisis de QTL para los parámetros del modelo ecofisiológico

Las bases genéticas de los parámetros del modelo ecofisiológico fueron estudiadas utilizando un análisis de QTL. Primero, se realizó un mapeo multi-caracter utilizando CIM y posteriormente un MIM multi-caracter. Sólo los caracteres correlacionados fueron analizados en conjunto. Se detectaron cinco QTL significativos para TCP_b , dos para PI_{BE} , y cinco para C_{BE} . Por otro lado, se detectaron 11 QTL para BE_b , PI_{NG} , y C_{NG} . No todos los QTL del modelo MT-MIM final fueron significativos para los caracteres individuales (datos no mostrados). Se detectaron 2 QTL significativos para BE_b , siete para PI_{NG} y siete para C_{NG} (Fig. III.2 y Tabla III.2).

Tabla III.2. Descripción de los QTL detectados para biomasa de espiga 15 días después de antesis (BE) y número de granos por planta (NGP), y para los parámetros del modelo ecofisiológico (ver Fig. III.2). Los efectos aditivos de los parámetros fueron calculados usando valores no transformados.

Análisis de QTL	Caracter	r ²	Cromosoma	Posición (cM)	LOD	Efecto aditivo
Caracteres finales	BE	0,45	3	120,0	5,7	-1,3
			4	120,0	5,0	1,3
			4	140,0	5,7	-1,3
			5	152,8	8,6	1,8
			7	40,0	8,8	-1,8
			7	60,9	7,7	1,5
			8	46,0	5,4	-1,3
	10	0,1	3,9	1,0		
	NGP	0,34	3	120,0	5,2	-22
			5	152,8	10,6	33
			7	40,0	6,2	-23
			7	60,9	10,9	34
			8	46,0	6,1	-26
	Parámetros del modelo ecofisiológico	TCP _b	0,39	2	113,7	2,8
2				133,8	5,6	-0,3
2				140,0	3,5	0,2
3				183,1	4,7	-0,3
4				0,1	2,6	0,2
PI _{BE}		0,17	3	183,1	4,5	-3,1
			8	49,5	2,7	2,4
C _{BE}		0,26	2	133,8	3,6	-0,19
			3	173,6	8,2	0,23
			3	183,1	4,6	-0,19
			7	147,7	6,5	0,02
			8	49,5	3,2	0,13
BE _b		0,25	1	69,1	4,6	-1,1
			7	91,8	4,8	1,2
PI _{NG}		0,25	1	69,1	10,3	-14,3
			2	105,0	13,6	8,9
			5	15,0	7,2	-6,5
			5	120,0	10,6	-12,3
			7	91,8	15,8	6,3
			8	101,1	14,3	-11,9
	8		120,0	5,8	6,6	
C _{NG}	0,25	1	69,1	5,3	-0,02	
		2	105,0	7,3	0,02	
		5	15,0	7,8	-0,02	
		5	120,0	19,5	-0,04	
		7	91,8	5,2	0,01	
		8	101,1	9,5	-0,02	
		9	90,0	3,3	-0,02	

El porcentaje de la variancia genética explicada por el modelo MIM multi-caracter para cada caracter varió entre 17 y 39% (Tabla III.2). Es importante destacar que la mayoría de los QTL detectados para NGP y BE no se localizaron en las mismas posiciones en las que se detectaron los parámetros del modelo (Fig. III.2 y Tabla III.2).

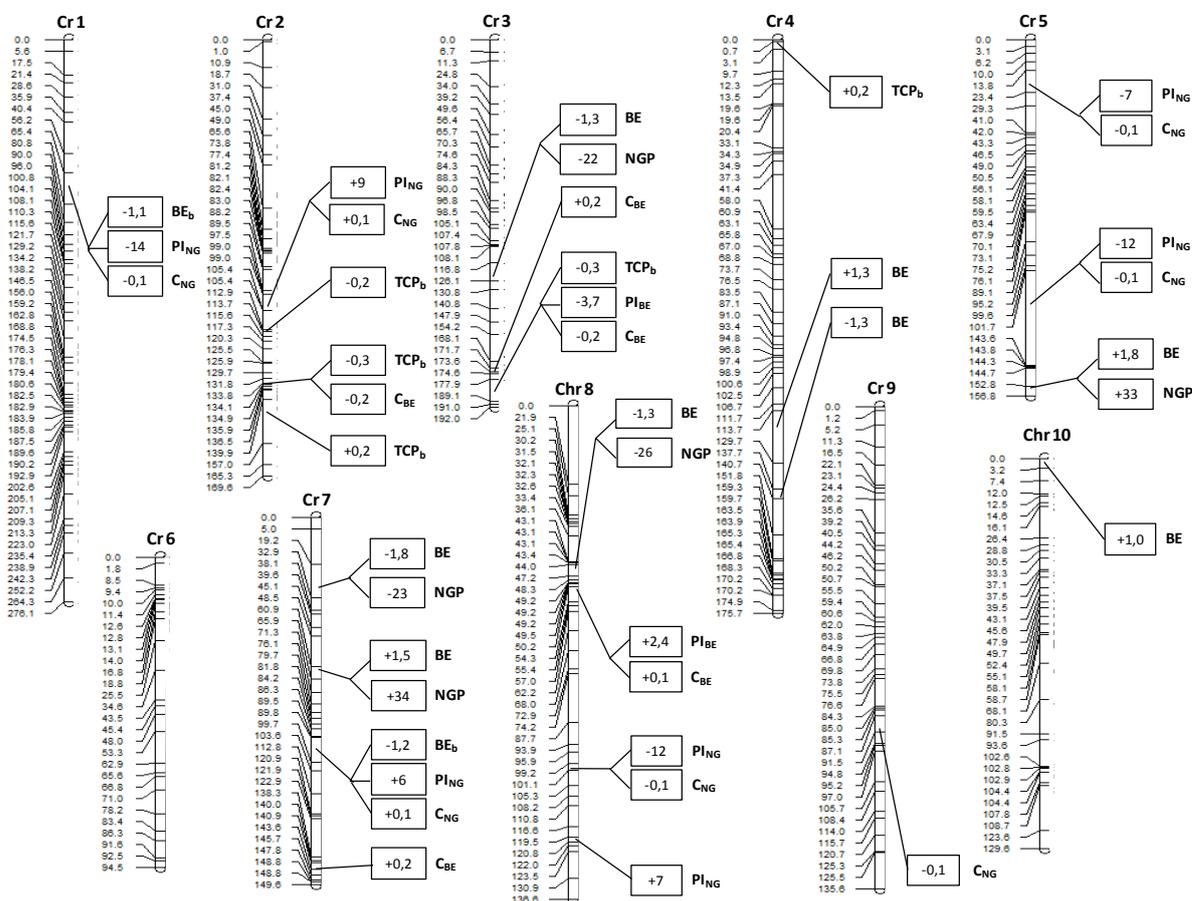


Figura III.2. Posiciones en los diferentes cromosomas de los QTL detectados para los ocho caracteres analizados: número de granos por planta (NGP), biomasa de espigas (BE), y parámetros del modelo ecofisiológico (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , PI_{NG} , C_{NG}). Los QTL están representados por recuadros con un conector con la posición correspondiente del cromosoma. Los valores en cada recuadro muestran el efecto aditivo de cada QTL. Los efectos aditivos corresponden al alelo de B73.

Predicción de BE y NGP

Se evaluó el valor de los dos enfoques de predicción para BE y NGP. Para el primer enfoque se utilizó la información de los QTL de BE y NGP de un análisis realizado sobre los caracteres finales *per se*. En el segundo enfoque se utilizó la información de los QTL para

los parámetros específicos de cada genotipo del modelo ecofisiológico. Se evaluó el valor predictivo de cada enfoque utilizando cinco conjuntos de datos independientes (Tabla III.3).

Los Exps. III y IV incluían RILs que no habían sido utilizadas en el análisis de QTL (44 genotipos aleatorios en el Exp. III y 115 genotipos aleatorios en el Exp. IV). Los Exps. V y VI se llevaron a cabo con genotipos que fueron previamente evaluados y otros que no. El Exp. VII incluyó los padres de la población (B73 y Mo17) evaluados en dos densidades contrastantes. En resumen, un total de 209 datos brindaron un amplio rango de genotipos y ambientes para evaluar los dos enfoques de predicción (Tabla III.1).

La BE y el NGP variaron significativamente entre los genotipos y entre las densidades evaluadas dentro de cada experimento (Tabla III.3). Se encontró interacción genotipo x densidad para BE en el Exp. VII y para NGP en los Exps. VI y VII. Considerando el conjunto de datos completos, la BE varió entre 0,8 y 43,7 g pl⁻¹ y el NGP entre 5 y 738 granos pl⁻¹.

En la Fig. III.3 se describe la relación entre los valores predichos y observados para BE y NGP calculados usando los diferentes enfoques. Los datos simulados fueron discriminados entre genotipos que eran coincidentes con las 125 RILs usadas para la determinación de parámetros y el resto de los genotipos. Los valores predichos de la BE y el NGP utilizando la información genética del análisis de QTL sobre los caracteres *per se* nunca pudieron estimar correctamente en diferentes ambientes las RILs coincidentes u otras RILs de la misma población (Figs. III.3A y 3B, Tabla III.4).

Tabla III.3. Información fenotípica para evaluar la precisión de las predicciones de biomasa de espiga acumulada 15 días después de antesis (BE) y número de granos por planta (NGP). Los datos de tasa de crecimiento por planta (TCP) alrededor de floración, su desvío (TCP_{DE}), la BE y el NGP son independientes a los utilizados para la estimación de los parámetros del modelo ecofisiológico.

Exp.		n	TCP	TCP _{DE}	BE	NGP
			g pl ⁻¹ d ⁻¹	g pl ⁻¹ d ⁻¹	g pl ⁻¹	granos pl ⁻¹
III	Media	44	3,4	0,7	17,9	381
	Mín.		1,6	0,3	5,5	131
	Máx.		5,1	1,2	43,7	564
	Genotipo (G)		*** (0,5) ^{a,b}	*** (0,2)	*** (4,1)	*** (64)
IV	Media	115	2,3	0,7	8,0	197
	Mín.		1,5	0,4	0,8	5
	Máx.		3,6	1,5	17,5	359
	G		*** (0,5)	*** (0,2)	*** (2,7)	*** (70)
V	Media	26	3,7	0,7	12,5	288
	Mín.		2,6	0,3	2,4	64
	Máx.		5,1	1,2	24,7	571
	G.		**	*** (0,2)	ns	*** (74)
	Densidad (D)		***	* (0,1)	*** (2,1)	*** (29)
	G*D	* (0,5)	ns	ns	ns	
VI	Media	20	3,3	0,6	17,7	346
	Mín.		2,1	0,4	8,1	215
	Máx.		4,8	0,9	31,8	573
	G		*** (0,3)	ns	*** (3,4)	***
	D		*** (0,2)	** (0,1)	*** (1,5)	***
	G*D		ns	ns	ns	** (87)
VII	Media	4	4,4	0,7	18,9	478
	Mín.		3,1	0,4	6,9	345
	Máx.		6,4	1,1	38,0	738
	G		**	ns	***	***
	D		***	ns	***	***
	G*D		** (0,4)	ns	** (4,7)	*** (53)

^ans: no significativo (p>0,05); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

^b valores de diferencia mínima significativa (LSD) (p<0,05).

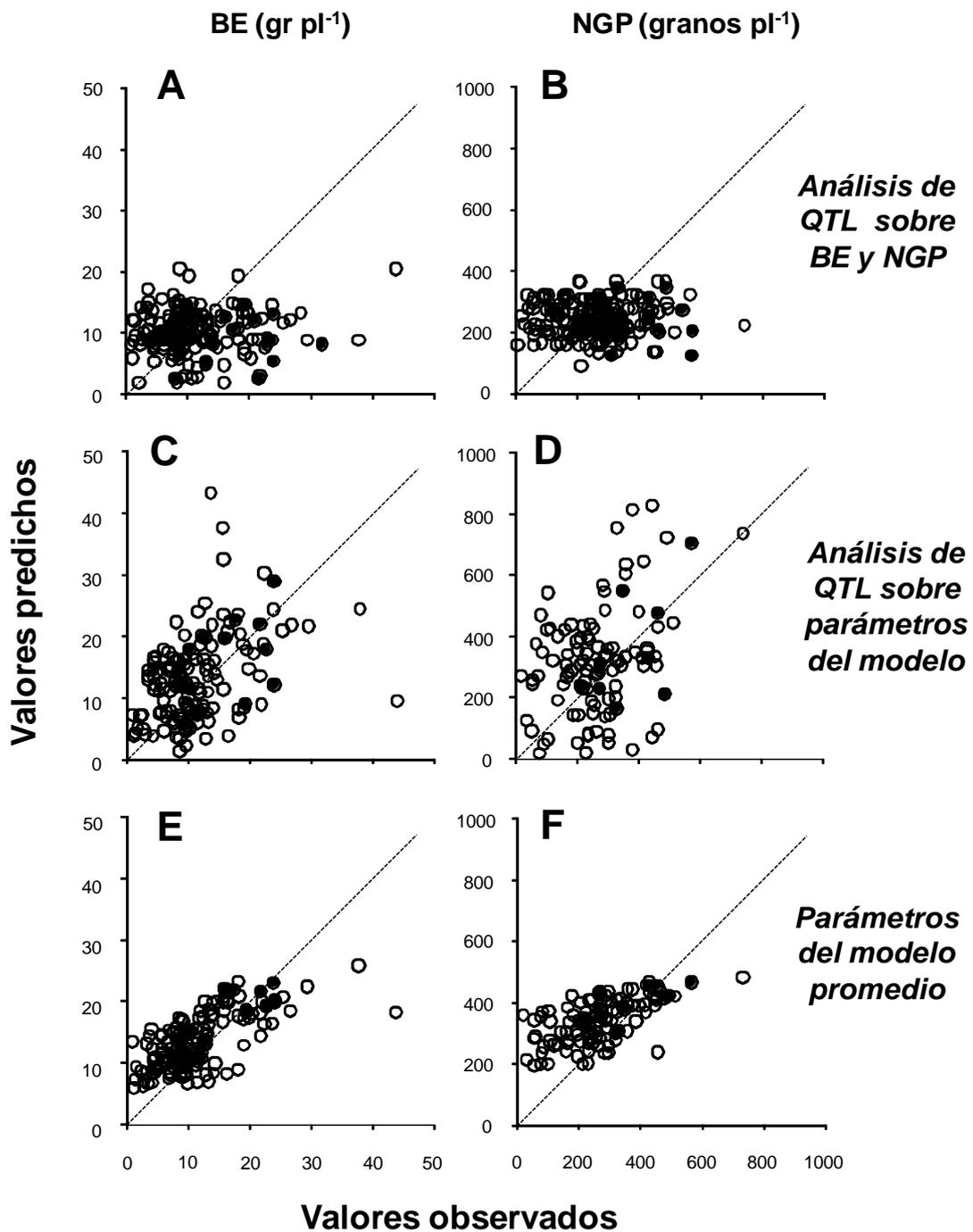


Figura III.3. Relación entre valores predichos y estimados de biomasa de espiga 15 días después de antesis (BE) y número de granos por planta (NGP). Las estimaciones se realizaron por medio de enfoques distintos. Las Fig. **A** y **B** muestran la BE (**A**) y el NGP (**B**) estimados directamente con la información genética de BE y NGP. Las Fig. **C** y **D** muestran la BE (**C**) y el NGP (**D**), estimadas utilizando el modelo ecofisiológico con los parámetros estimados a partir de información genética. Las Fig. **E** y **F** muestran la BE (**E**) y NGP (**F**) estimados con el modelo ecofisiológico con parámetros

fenotípicos promedio para todas las RILs. Los círculos blancos representan genotipos que no fueron utilizados para la detección de QTL, los círculos negros representan genotipos coincidentes.

Las predicciones de BE y NGP usando información genética del análisis de QTL sobre los parámetros de las curvas respuesta del modelo ecofisiológico e incorporando los datos de TCP_{50%} y TCP_{DE} mejoraron la precisión de las estimaciones (Figs. III.3C y III.3D, Tabla III.4). Las predicciones de BE y NGP, evaluando ya sea las mismas RILs usadas en el análisis de QTL u otras RILs, fueron más precisas y significativas ($p < 0,001$) que las predicciones basadas en la información de QTL de los caracteres finales *per se* (Tabla III.4).

Tabla III.4. Coeficiente de determinación y significancia de la regresión lineal entre biomasa de espiga (BE) y número de granos por planta (NGP) observados y estimados. Se comparan tres tipos de predicciones diferentes: usando información de QTL de los caracteres finales, usando los QTL de los parámetros del modelo y usando valores medios de los parámetros del modelo. Los datos se clasifican en: (i) las 125 RILs coincidentes usadas en el análisis de QTL pero evaluadas en otros ambientes, (ii) RILs diferentes de la misma población que no fueron usados en el análisis de QTL y evaluadas en otros ambientes y (iii) todas las RILs juntas (coincidentes o diferentes).

Datos	QTL BE	BE QTL de parámetros del modelo	BE Valor medio de parámetros del modelo	QTL NGP	NGP QTL de parámetros del modelo	NGP Valor medio de parámetros del modelo
RILs coincidentes (n: 22)	$r^2: <0,01$; ns ^a	$r^2:0,27$; *	$r^2:0,68$; ***	$r^2: <0,01$; ns	$r^2:0,28$; *	$r^2:0,45$; ***
RILs diferentes (n: 185)	$r^2: <0,01$; ns	$r^2:0,10$; ***	$r^2:0,41$; ***	$r^2: <0,01$; ns	$r^2:0,10$; ***	$r^2:0,33$; ***
Todas las RILs juntas (n: 207)	$r^2: <0,01$; ns	$r^2:0,13$; ***	$r^2:0,46$; ***	$r^2: <0,01$; ns	$r^2:0,12$; ***	$r^2:0,37$; ***

^ans: no significativo ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A pesar de que la predicción incluyendo la información de los QTL para los parámetros del modelo aumentó la precisión general al ser comparada con predicciones usando información de los QTL de los caracteres *per se*, el uso de valores de parámetros específicos para cada RIL no fue la mejor opción. En cambio, usar un valor promedio común

para cada parámetro para toda la población de RILs y sólo considerar la información específica de cada RIL de crecimiento por planta ($TCP_{50\%}$) y su variabilidad (TCP_{DE}) mostró las mejores precisiones de las predicciones para BE y NGP ($r^2= 0,46$, $p<0,001$ y $r^2= 0,37$, $p<0,001$, para BE y NGP, respectivamente; Tabla III.4, Fig. III.3E y 3F). Este resultado sugiere que el aumento de la precisión de las predicciones al usar información de QTL de los parámetros del modelo ecofisiológico estuvo mayormente relacionado con incorporar diferencias genóticas relacionadas al crecimiento por planta alrededor de floración.

DISCUSIÓN

En el presente Capítulo III se determinaron las bases genéticas de dos caracteres de fuerte interés práctico para rendimiento (BE y NGP) realizando un análisis de QTL sobre los caracteres *per se* y sobre los parámetros del modelo ecofisiológico planteado (i.e., TCP_b , PI_{BE} , C_{BE} , BE_b , PI_{NG} , C_{NG}). Los parámetros del modelo han mostrado variaciones significativas entre genotipos comerciales elite y exóticos en estudios previos (Tollenaar et al., 1992; Andrade et al., 1999; Echarte et al., 2004; Borrás et al., 2007; Pagano y Maddonni, 2007; D'Andrea et al., 2008; Borrás et al., 2009).

Como primer resultado importante del Capítulo III cabe destacar que las regiones cromosómicas detectadas en esta tesis relacionadas a los caracteres *per se* (BE y NGP) y las regiones relacionadas a los parámetros del modelo ecofisiológico que describen la respuesta de estos caracteres al ambiente son diferentes. Estos resultados sugieren que en general las regiones involucradas en el control genético de la partición a biomasa reproductiva o en la fijación de granos no coinciden con las regiones relacionadas a BE y NGP *per se*.

La disección fisiológica y el modelado de los caracteres proveen un camino por el que los modelos de crecimiento de cultivos pueden contribuir a integrar las tecnologías de genética molecular y la mejora de cultivos (Chapman et al., 2003; Hammer et al., 2006). Los componentes principales del proceso son la comprensión del carácter y su modelado, seguidos por la determinación de la arquitectura genética de los caracteres. Messina et al. (2011) aplicaron este enfoque genotipo a fenotipo para múltiples caracteres, y simularon diferentes escenarios dentro de un programa de mejoramiento de maíz operativo. Este modelo de simulación de cultivos incluye algoritmos para simular el NGP basados en perspectivas fisiológicas similares a las aplicadas en el presente capítulo de la tesis. Una hipótesis central de la presente tesis es que el modelo conceptual descrito en la Fig. III.1 es una gran oportunidad para predecir variaciones en la BE y el NGP para distintos genotipos y ambientes.

Se reconoce que uno de los beneficios de estudiar las bases genéticas de un carácter en particular con un enfoque basado en un modelo ecofisiológico es que los efectos de la interacción genotipo x ambiente están considerados implícitamente (Hunt et al., 1993; Messina et al., 2011). Esto es debido a que los modelos de crecimiento de cultivos actuales están diseñados para predecir las consecuencias de las interacciones genotipo x ambiente x manejo (Hammer et al., 2006). Estudiar las bases genéticas de un carácter cuantitativo *per se* (en términos de QTL) en diferentes ambientes generalmente brinda resultados

inconsistentes en la mayoría de los casos. La literatura contiene diversos ejemplos de este tipo para NGP o caracteres similares en maíz (Agrama et al., 1999; Beavis et al., 1994a; Ribaut et al., 1999; Frova et al., 1999; Peng et al., 2011). En el caso específico de esta tesis las variables ambientales o de manejo afectarían la BE o el NGP final a través de modificaciones en la TCP. Las interacciones genotipo x ambiente son una propiedad emergente del modelo considerado (Hammer et al., 2005).

Para realizar una primera aproximación a las bases genéticas del NGP se comparó un estudio de QTL sobre parámetros de un modelo ecofisiológico de cultivos con respecto a un enfoque tradicional, que es el análisis de QTL sobre los caracteres *per se*. Incluir la variancia genética en los parámetros de las curvas respuesta (i.e., información de los QTL) incrementó la precisión de las predicciones de la BE y el NGP. El incremento estuvo principalmente relacionado a incorporar datos específicos de cada genotipo sobre la TCP y en menor medida con la incorporación de los valores de los parámetros del modelo ecofisiológico que describen las diferencias en partición de biomasa y fijación de granos específicos de cada genotipo. En relación a esto último, Hernández et al. (2014) encontraron que las diferencias en NGP en condiciones de alta densidad entre híbridos comerciales actuales de Argentina no sólo están relacionadas a partición de biomasa y eficiencia en el uso de la biomasa para fijar granos, sino también a crecimiento de las plantas en condiciones de estrés. Esto demuestra la importancia de los parámetros del modelo ecofisiológico tanto como del crecimiento de las plantas para explicar diferencias genotípicas en el NGP.

La baja precisión de las predicciones al combinar un modelo ecofisiológico de cultivos con información de QTL podría estar relacionada a la acumulación de distintas fuentes de error: de los experimentos, del modelo y de las estimaciones de los QTL (Uptmoor et al., 2008). Con respecto a esto último, las estimaciones de los efectos asociadas a los QTL identificados podrían ser sobrestimadas cuando se evalúa un número de individuos reducido (i.e., efecto Beavis; Beavis, 1994b; Xu, 2003).

Otra posible causa de la reducida precisión de las estimaciones de BE y NGP cuando se realizó el análisis de QTL sobre los parámetros del modelo es el modelo utilizado. Determinar las bases genéticas de los parámetros del modelo en lugar de los caracteres finales *per se* es un enfoque que ha sido utilizado previamente. Reymond et al. (2003), Yin et al. (2005) y Uptmoor et al. (2008) aplicaron este enfoque para otros caracteres (expansión de hojas en maíz, tiempo a floración en cebada y tiempo a inducción floral y floración en *Brassica oleracea*, respectivamente). Las predicciones realizadas con los parámetros medidos fueron más precisas que las predicciones realizadas con los parámetros estimados

en base a los QTL. Sin embargo, este no siempre fue el resultado. Yin et al. (2000) evaluó la habilidad de un modelo de crecimiento de cultivos para predecir las variaciones en rendimiento en un conjunto de RILs en cebada. En este estudio ninguna de las predicciones de rendimiento basadas en los parámetros estimados a partir de QTL o en los parámetros medidos fueron precisas, sugiriendo que la fisiología detrás del modelo era inapropiada. A pesar de que no fue posible realizar una evaluación a esta comparación en particular en esta tesis, es importante identificar la posibilidad de que el modelo utilizado no es lo suficientemente robusto para la aplicación que se propone en la presente tesis.

Yin et al. (2005) propusieron que el análisis de QTL puede remover parte del error aleatorio de los parámetros del modelo medidos originalmente y consecuentemente mejorar las predicciones. Sin embargo, esto no es suficiente para compensar la disminución en la precisión de las predicciones debido a la variancia genética residual que no es capturada por los QTL identificados. Además, la variación fenotípica abarcada por los QTL identificados fue generalmente baja en este estudio (al igual que en la presente tesis, ver Tabla III.2). Wang et al. (2012) comparó un análisis de QTL para caracteres medidos y otros derivados matemáticamente y concluyó que el uso de caracteres derivados en el mapeo de QTL puede aumentar el número de QTL y disminuir la proporción de la variancia fenotípica de la que puede ser explicada por los QTL de los caracteres originales. La mayor complejidad de la arquitectura genética de los caracteres derivados reduce la detección de QTL y aumenta la detección de falsos positivos. Sin embargo, ellos manifiestan que para caracteres derivados el poder de detección es reducido, pero las posiciones detectadas no estuvieron sesgadas. Los parámetros del modelo ecofisiológico podrían ser considerados como caracteres derivados de otros caracteres medidos.

En los resultados del análisis de QTL puede observarse que varios QTL detectados se localizaron en posiciones cercanas con efectos opuestos. Este es el caso de los QTL localizados en el cromosoma 2 (posición 134 y 140 cM), 3 (posición 174 y 183 cM), 4 (posición 120 y 140 cM), 7 (posición 40 y 61 cM) y 8 (posición 101 y 120 cM). Existen evidencias previas en el uso de MIM con resultados similares (Kao et al., 1999; Hernandez-Valladares et al., 2004; Balint-Kurti et al., 2007). La base de esto es que MIM es un método preciso y potente para el mapeo de QTL con capacidad de detectar QTL cercanos ligados, que pueden no ser detectados con otros métodos.

La existencia de QTL afectando el NGP o caracteres similares en maíz han sido reportados por muchos autores quienes detectaron una gran cantidad de regiones de ADN distribuidas a lo largo del genoma. Muchos de los QTL detectados en este estudio coincidieron con las posiciones de QTL detectados en estudios anteriores. Por ejemplo, en

el cromosoma 1 (bin 1,03), se detectó un QTL para los parámetros relacionados con la eficiencia de fijación de granos (BE_b , PI_{NG} y C_{NG}). En la misma región (bin 1,03; *bnlg439*) Liu et al. (2010) encontraron un QTL para número de granos por hilera en condiciones de alto y bajo N. Por otro lado, en la presente tesis se detectaron dos QTL para BE y NGP en el cromosoma 7 (bin 7,02). Peng et al. (2011) encontraron un QTL para NGP y para rendimiento en una posición cercana (bin 7,02; *bnlg1094–bnlg1579*). En el bin 7,04 se detectó un QTL para BE_b , PI_{NG} y C_{NG} . En otros trabajos se detectaron QTL en posiciones cercanas. Frascaroli et al. (2009) encontraron un QTL para NGP en el bin 7,03 (*umc1408–umc1134*) y otro en el bin 7,04 (*umc1251–umc1029*). Austin y Lee (1998) encontraron QTL para diámetro de espiga y rendimiento en una región entre el bin 7,03 y 7,05 (*umc98B–bnl15.21–umc110–bnl7.61–isull–bn18.39–bn18.44A–umc35*). En el bin 7,05 en la presente tesis se detectó un QTL para el parámetro C_{BE} . Por último, en el bin 8,07 se detectaron QTL para PI_{NG} y C_{NG} . En la misma región Frascaroli et al. (2009) detectaron un QTL para NGP (*umc1149–npi268a*) y Austin y Lee (1998) detectaron un QTL para rendimiento y largo de espiga (*phi014–umc48–npi268–umc7*). En resumen, muchas de las regiones detectadas en esta tesis doctoral fueron regiones de interés reportadas en estudios previos utilizando diversos germoplasmas y ambientes de crecimiento.

CONCLUSIONES

Se identificaron regiones genómicas (QTL) asociadas directamente con la BE y el NGP. Se encontraron asociaciones positivas entre los efectos aditivos de los QTL de BE y NGP que se localizaron en las mismas posiciones, confirmando la dependencia del NGP a la BE.

Se identificaron QTL de parámetros del modelo ecofisiológico que relaciona NGP y BE con la TCP alrededor de floración (descritos en el Capítulo II). En general, los QTL detectados para los diferentes parámetros del modelo no se localizaron en las mismas posiciones que los QTL detectados para BE y NGP *per se*.

No fue posible predecir la BE y el NGP de experimentos independientes usando los QTL detectados para estos caracteres directamente. La información de los QTL para los parámetros del modelo ecofisiológico ayudó a mejorar las predicciones de la BE y el NGP de experimentos independientes, indicando el valor de este enfoque.

Incluir los valores genotípicos específicos de los parámetros estimados con la información de los QTL aumentó la precisión de las predicciones del NGP y la BE. Sin embargo, usar un valor promedio para cada parámetro fue una mejor opción. Esto indicó que la mejora en la precisión de la predicción al ser comparada con el enfoque de QTL *per se* estuvo principalmente relacionada con incorporar información de la TCP y no con incorporar información de parámetros genotípicos específicos que describen la partición de biomasa y la eficiencia de fijación de granos.

Los resultados del Capítulo III son un importante punto de partida para estudios relacionados a la determinación genética del número de granos en maíz y sus determinantes fisiológicos. Se describieron regiones del cromosoma específicas, que merecen mayor disección.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años los marcadores se han usado ampliamente para estudiar caracteres cuantitativos en diferentes especies. A pesar de que una gran cantidad de QTL fueron reportados, estos QTL han sido parcialmente explotados en programas de mejoramiento (Bernardo, 2008). Se ha demostrado la utilidad de la utilización de marcadores para caracteres de herencia simple, pero para los caracteres cuantitativos complejos su uso ha sido limitado (Eathington et al., 2007). El rendimiento y sus componentes son caracteres cuantitativos complejos, y el número de granos es el responsable de la mayor parte de la variación observada en rendimiento en maíz y en la mayoría de los cultivos extensivos (Early et al., 1967; Otegui, 1995; Chapman y Edmeades, 1999).

Los caracteres cuantitativos complejos están afectados por muchos genes y son influenciados por el ambiente. La falta de consistencia entre resultados de estudios de QTL está mayormente relacionada a las interacciones entre el genotipo y el ambiente (Bernardo, 2008). Una posible solución para resolver interacciones genotipo x ambiente es usar modelos inspirados en procesos fisiológicos (Hammer et al., 2006). Estos modelos son ecuaciones con parámetros específicos que describen la respuesta del carácter al ambiente. Estos modelos de respuesta varían para diferentes genotipos, por lo que los parámetros de las ecuaciones son específicos de cada genotipo. Estos parámetros permiten conectar el ambiente con el carácter final. De esta forma, la información genética (QTL) se combina con modelos ecofisiológicos generando una oportunidad para estudiar las interacciones entre los genotipos y el ambiente. Además, esta aproximación permite predecir el comportamiento del cultivo en ambientes diferentes al que se estimaron los parámetros del modelo ecofisiológico (Reymond et al., 2003; Yin et al., 2004).

En este trabajo de tesis se implementó esta aproximación para estudiar el número de granos en maíz. Se realizó un análisis de QTL sobre los parámetros de un modelo ecofisiológico que relaciona el NGP con la BE acumulada al final del período de floración, y esta última con la TCP alrededor de floración. Este modelo describe las diferencias entre genotipos en eficiencia de fijación de granos y de partición de biomasa hacia estructuras reproductivas. Con esta aproximación se pudo establecer un vínculo entre el fenotipo y el genotipo.

En general los QTL detectados para los caracteres NGP y BE no se localizaron en las mismas regiones genómicas que los parámetros del modelo ecofisiológico (Tabla III.2). A

su vez, los QTL para los parámetros del modelo involucrados en diferentes procesos (i.e., eficiencia de fijación de granos o partición de biomasa hacia estructuras reproductivas) se localizaron en general en diferentes regiones genómicas (Tabla III.2). Este resultado es un fuerte indicio que indica que son procesos independientes.

Con los QTL detectados se buscó profundizar el alcance de esta aproximación. Se intentó predecir el NGP y la BE en ambientes diferentes a aquel donde se obtuvieron los datos fenotípicos para el análisis de QTL. La precisión de las predicciones combinando la información genética con el modelo ecofisiológico fue más precisa que usando solamente información de los QTL para NGP y BE *per se*. Sin embargo, usar valores promedio de los parámetros del modelo ecofisiológico permitió realizar predicciones más precisas que con parámetros estimados a partir de la información de los QTL detectados (Fig. III.3).

Yin y Struik (2008) manifestaron que el modelado y el análisis basado en modelos son capaces de generar nuevas hipótesis y métodos, y que la implementación exitosa de los modelos es un proceso iterativo. Se especula que el desarrollo e implementación de estas herramientas para el mejoramiento no va a ser simple, pero van a modificar la forma en que se estudian los caracteres cuantitativos en el largo plazo (Hammer et al., 2006; Messina et al., 2009).

Los resultados de esa tesis corresponden a una sola población de RILs. Si bien esta población es muy reconocida debido a la alta utilización que tuvieron sus líneas parentales (B73 y Mo17) en el mejoramiento genético de la especie, la misma no es completamente representativa de la variabilidad genética existente en la especie ya que sólo está compuesta por dos alelos. Estudiando las bases genéticas del peso de grano en poblaciones interconectadas, se encontró que el fondo genético es relevante ya que una alta proporción de los QTL detectados fueron específicos de las diferentes poblaciones evaluadas (Alvarez Prado et al., 2014). Li et al. (2009) estudiaron la influencia del fondo genético sobre la detección de QTL para rendimiento y caracteres relacionados. Para ello evaluaron dos poblaciones con diferente fondo genético de maíz dentado y encontraron una importante influencia en todos los caracteres analizados. En síntesis, en la discusión del Capítulo III se describen las similitudes entre nuestros resultados y los de trabajos previos, y es razonable que si se evalúan los mismos caracteres en diferente germoplasma, una proporción de los QTL encontrados en esta tesis no sean detectados.

Los resultados de la presente tesis confirman la relación del NGP con la BE y de esta última con la TCP alrededor de floración. Posteriormente, se describió la existencia de variabilidad genotípica para los parámetros que caracterizan ambas respuestas en una población de RILs. La variabilidad genotípica para dichos parámetros ya era conocida para

un número reducido de genotipos (i.e., Echarte et al., 2004; Borrás et al., 2009), pero información relacionada a la correlación entre líneas parentales y sus híbridos derivados para nuestros parámetros de interés es limitada (Echarte y Tollenaar, 2006). Dicha información existe para la respuesta de N (D'Andrea et al., 2013), y es relevante para el desarrollo de híbridos. Cualquier información sobre líneas endocriadas parentales que indique la performance del híbrido derivado es importante. Munaro et al. (2011) encontraron que la heterosis es importante para el crecimiento de planta y para la acumulación de biomasa de espiga, pero al momento no se conoce que efecto puede llegar a tener la heterosis sobre los parámetros del modelo ecofisiológico evaluados en este trabajo. Sin embargo, en el Capítulo II la heredabilidad de los parámetros del modelo ecofisiológico fue estimada y detallada. Esto es relevante, ya que hasta el momento no existía ningún reporte sobre la heredabilidad de dichos parámetros.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS PLANTEADAS

Hipótesis específicas

- *Las líneas de la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17) difieren en el NGP a madurez y BE acumulada alrededor de floración.*

La población de RILs IBM Syn4 fue generada con cuatro ciclos de recombinación luego de la F₂. Los parentales de la población (B73 y Mo17) han sido de alta relevancia para el mejoramiento del maíz y son contrastantes para el número de granos. Se evaluó la población en dos ambientes contrastantes, y se encontró una importante variabilidad en la BE y en el NGP fijados. Los genotipos y ambientes que acumulan mayor BE son los que fijan mayor NGP. Estos resultados se encuentran expuestos en la Tabla II.1 y en la Fig. II.1.

Las evidencias recolectadas en la presente tesis permiten aceptar esta primera hipótesis.

- *Las líneas de la población de RILs muestran diferencias en los parámetros que definen las respuestas de acumulación de la BE ante variaciones en la TCP alrededor de floración (TCP_b , PI_{BE} , C_{BE}) y del NGP ante variaciones en la BE acumulada (BE_b , PI_{NG} y C_{NG}).*

El NGP mostró estar estrechamente relacionado a la BE acumulada al final del período de floración, y a su vez la BE mostró una fuerte correlación con la TCP alrededor de floración. Estas relaciones fueron descritas por curvas que tienen parámetros específicos para los diferentes genotipos. Para construir las curvas fueron empleados datos de ambientes notoriamente contrastantes de manera de explorar un amplio rango de TCP y estimar los parámetros con mayor exactitud (Tabla II.1). En la población evaluada se encontró una amplia variabilidad para todos los parámetros del modelo ecofisiológico empleado (Fig. II.3). Se encontraron correlaciones positivas entre los parámetros de una misma curva respuesta (i.e. BE vs. TCP o NGP vs. BE) pero no con el resto de los parámetros.

Las evidencias recolectadas en la presente tesis permiten aceptar esta segunda hipótesis planteada.

- *Existen QTL asociados con los caracteres NGP y BE per se y con los parámetros del modelo ecofisiológico para la relación entre NGP, BE y TCP durante el período de floración.*

Se detectaron varios QTL para todos los caracteres evaluados en diferentes regiones del genoma. Los resultados están descriptos con detalle en la Tabla III.2 y en la Fig. III.2 La proporción de la variancia fenotípica explicada fue de 45% para BE, 34% para NGP, 39% para TCP_b, 17% para PI_{BE}, 26% para C_{BE}, 25% para BE_b, 25% para PI_{NG} y 25% para C_{NG}.

Las evidencias que se describen en mi tesis me permiten aceptar la tercera hipótesis de la tesis.

- *Las regiones cromosómicas (o QTL) asociadas a los parámetros ecofisiológicos de la determinación del NGP son coincidentes con regiones asociadas a los caracteres NGP y BE per se.*

La variación del NGP en las distintas condiciones ambientales puede ser explicada por las variaciones en la BE acumulada al final del período de floración y la eficiencia de utilización de esta biomasa para fijar granos que tenga cada genotipo. A su vez, las variaciones de la BE pueden ser explicadas por la TCP alrededor de floración y la partición hacia estructuras reproductivas que tenga cada genotipo específico. Por ello, el NGP en los distintos ambientes está determinado no solo por los parámetros del modelo ecofisiológico si no también por la TCP alrededor de floración.

Los parámetros del modelo ecofisiológico no se encontraron correlacionados con la BE acumulada ni con el NG. Al realizar el análisis de QTL la mayoría de los QTL detectados para los parámetros del modelo ecofisiológico no coincidieron con los QTL detectados para el NGP o la BE (Fig. III.2). Los resultados descritos en la Tabla III.2 nos permiten concluir que en la población evaluada la mayor parte de las regiones cromosómicas relacionadas a los parámetros del modelo ecofisiológico no son coincidentes con las regiones del NGP o la BE.

Los resultados descritos en la tesis nos permiten aceptar esta hipótesis sólo en forma parcial.

- *La información de un análisis de QTL sobre los parámetros del modelo ecofisiológico que describe la respuesta de NGP a diferentes condiciones de crecimiento de planta mejora la capacidad de predicción de NGP y BE en diferentes condiciones ambientales respecto a predicciones a partir de información de un análisis de QTL sobre NGP y BE per se.*

Cuando se compararon las predicciones realizadas a partir de la información de los QTL detectados para el NGP y la BE *per se* con respecto a las predicciones realizadas a partir de los QTL de los parámetros del modelo ecofisiológico planteado, las predicciones resultaron más precisas con el enfoque que utiliza el modelo ecofisiológico. Estos resultados están detallados en la Fig. III.3 y en la Tabla III.4. Sin embargo, la mejora en la precisión estuvo relacionada a incorporar datos específicos de cada genotipo sobre crecimiento de las plantas y en menor medida con la incorporación de los valores de los parámetros del modelo ecofisiológico específicos de cada genotipo que describen las diferencias en partición de biomasa y fijación de granos.

Los resultados de la presente tesis nos permiten aceptar la presente hipótesis sólo en forma parcial.

INVESTIGACIONES FUTURAS

Necesidad de evaluar otras poblaciones. Los resultados del análisis de QTL presentados en esta tesis fueron detectados en la población biparental IBM Syn4 (B73 x Mo17). Al evaluar diferentes poblaciones podemos esperar QTL distintos ya que cada QTL puede segregarse en algunas poblaciones y en otras no. De los QTL detectados en esta tesis

no se sabe si son estables al variar el fondo genético. En la discusión del Capítulo III se describen las regiones que encontramos y son concordantes con estudios previos disponibles en la bibliografía. Las poblaciones interconectadas permiten evaluar este tipo de cuestiones, ya que son generadas a partir del cruzamiento de líneas endocriadas con un parental en común y permiten el estudio de la interacción de los QTL con el fondo genético (Holland, 2007; Bernardo, 2008; Alvarez Prado et al., 2014). Este tipo de análisis permite evaluar la consistencia de los efectos de los alelos a través de las poblaciones y cómo influyen los efectos epistáticos de los QTL según su fondo genético (Blanc et al., 2006). Para continuar con el estudio de determinación de las bases genéticas de número de granos en maíz, sería necesario evaluar poblaciones conectadas con un parental común. Esto no sólo permitirá evaluar la interacción de los QTL con el fondo genético sino también aumentar la variabilidad genética resultando en un mayor poder de detección de QTL. Un ejemplo de poblaciones interconectadas es la población NAM (*nested association mapping population*) para la que fueron cruzadas 25 líneas endocriadas diversas con la línea de referencia B73, con aproximadamente 200 líneas por cada familia (McMullen et al., 2009).

Para avanzar en este tema el grupo de trabajo del Dr. Borrás tiene una población interconectada, la cual ha sido recientemente utilizada para estudiar las bases genéticas del peso del grano en maíz (Alvarez Prado et al., 2014).

Una forma de validar los QTL detectados es crear una población segregante con gran cantidad de individuos cruzando líneas casi isogénicas (NILs de su sigla en inglés) que sólo difieran en la constitución alélica en el segmento de cromosoma que contiene el QTL de interés. Debido a la ausencia de otros QTL segregantes, el QTL objetivo se convierte en la única fuente de variación. Por lo tanto, el poder de detección, la resolución y determinación de los efectos genéticos serán mejorados. Existen ejemplos de esta aproximación para componentes de rendimiento en maíz (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2013). Los resultados no siempre fueron exitosos y esto puede estar relacionado a la baja proporción de la variación fenotípica que explica cada uno de los QTL.

Búsqueda de genes candidatos a partir de los presentes resultados. A partir de la detección de posiciones de los QTL en un intervalo de longitud reducida es posible realizar una búsqueda de los genes candidatos comprendidos en dicha región (Liu et al., 2012; Alvarez Prado et al., 2013). Esta información está disponible para la línea de referencia B73 (RefGen_v2; www.maizegdb.org). Por ejemplo, Liu et al. (2012) identificaron seis genes candidatos en el intervalo del QTL estudiado para componentes del rendimiento en maíz. A

partir de esto evaluaron la expresión de los genes en dos NILs de la población en estudio y encontraron que dos genes tenían expresión diferencial, resultando genes candidatos.

Posteriormente, es necesario realizar estudios que confirmen si el o los genes estudiados dentro del QTL son los responsables de las variaciones en el carácter estudiado. La evidencia que permite concluir si el gen es el responsable o no es la demostración que el reemplazo de las diferencias genotípicas expliquen las diferencias fenotípicas. Esta prueba se puede realizar con la tecnología de silenciamiento y/o con la caracterización de mutantes de la especie (Glazier et al., 2002).

Estudios de relación línea – progenie. Para el mejoramiento, la evaluación de caracteres a nivel de líneas tiene poco valor si el desempeño de las líneas endocriadas no está correlacionado con el desempeño de los híbridos derivados (Hallauer et al., 2010). La información relacionada a la correlación entre líneas parentales y sus híbridos derivados para los parámetros del modelo ecofisiológico es limitada. Echarte y Tollenaar (2006) evaluaron el modelo ecofisiológico en tres líneas endocriadas y dos híbridos simples derivados con una línea en común. Es necesario evaluar los caracteres de interés en un mayor número de líneas en combinación con diferentes *testers* en diversos ambientes.

Realizar un estudio de selección genómica. En los estudios tradicionales de mapeo de QTL, el análisis consiste en dos pasos, primero identificar los QTL y luego estimar sus efectos (Jannink et al., 2010). Los QTL de efecto menor no son detectados en este tipo de análisis debido a la necesidad de balancear la posibilidad de perder los QTL de efecto menor con la detección de falsos positivos (Cabrera-Bosquet et al., 2012). El objetivo de la selección genómica es mejorar la precisión de la selección asistida por marcadores para caracteres cuantitativos debido a que es capaz de capturar los efectos de los QTL mayores y menores con una cobertura de todo el genoma. En lugar de intentar identificar regiones individuales que estén significativamente asociadas con un carácter, la selección genómica usa todos los datos de los marcadores como predictores de dicho carácter y consecuentemente brinda predicciones más precisas (Meuwissen et al., 2001, Jannink et al., 2010). La selección genómica usa los marcadores moleculares sin entender los mecanismos biológicos responsables (Cabrera-Bosquet *et al.*, 2012). Cuando los marcadores son introducidos en el análisis algunos efectos genéticos serán capturados por marcadores en desequilibrio de ligamiento con los QTL y los efectos genéticos residuales serán explicados de acuerdo a la relación entre los individuos (Heffner et al., 2009).

Existen evidencias que la selección genómica es más eficiente que la selección asistida por marcadores, sobre datos simulados (Bernardo y Yu, 2007) o predicciones sobre datos reales (Peiffer et al., 2013). La eficiencia de la selección genómica varía de acuerdo a la heredabilidad y a la estructura genética de los caracteres evaluados (Combs y Bernardo, 2013). La aplicación de este método es considerado como una herramienta de gran potencial para la predicción de caracteres como el rendimiento, combinando la información genética con modelos ecofisiológicos. Son necesarias futuras investigaciones para la optimización del uso de la selección genómica. Los datos de la presente tesis se podrían utilizar para evaluar la precisión de las predicciones con este método.

CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones de la presente tesis son:

- Se identificaron varios QTL para BE y NGP en maíz. Se encontraron asociaciones positivas entre los efectos aditivos de los QTL de BE y NGP que se localizaron en las mismas posiciones, confirmando la dependencia del NGP a la BE.
- Se identificaron QTL de parámetros de las curvas de respuesta del NGP a la BE y de esta última con la TCP alrededor de floración. Los QTL detectados para los diferentes parámetros del modelo no se localizaron en las mismas posiciones que los QTL detectados para BE y NGP *per se*.
- No fue posible predecir la BE y el NGP de experimentos independientes usando los QTL detectados para estos caracteres directamente.
- Usando la información de los QTL para los parámetros del modelo que describe la curva respuesta ante BE, NGP y TCP se obtuvieron predicciones más precisas de BE y NGP en experimentos independientes, que con los QTL de BE y NGP *per se*, indicando el valor del enfoque que emplea el modelo ecofisiológico.
- A pesar de que incluir los valores genotípicos específicos de los parámetros estimados con la información de los QTL aumentó la precisión de las predicciones de NGP y BE, usar un valor promedio para cada parámetro fue una mejor opción. Esto indicó que la mejora en la precisión de la predicción al ser comparada con el enfoque de los QTL *per se* estuvo principalmente relacionada con incorporar datos de tasa de crecimiento de plantas y no a incorporar parámetros genotípicos específicos que describen la partición de biomasa y diferencias en fijación de granos.

- Los resultados de la presente tesis son un importante punto de partida de la determinación genética del número de granos en maíz. Se describieron regiones del cromosoma específicas, que merecen mayor disección.

REFERENCIAS

- Abertondo, V.J. 2007. Phenotypic analysis of intermated B73 x Mo17 (IBM) population. M.Sc. Thesis, Iowa State University, USA.
- Agrama, H.A.S., Zakaria, A.G., Said, F.B., Tuinstra, M. 1999. Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. *Mol. Breed.* 5, 187–195.
- Alvarez Prado, S., López, C.G., Gambín, B.L., Abertondo, V.J., Borrás, L. 2013. Dissecting the genetic basis of physiological processes determining maize kernel weight using IBM (B73 x Mo17) Syn4 population. *Field Crops Res.* 145, 33-43.
- Alvarez Prado, S., López, C.G., Senior, M.L., Borrás, L. 2014. The genetic architecture of maize (*Zea mays* L.) kernel weight determination. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4, 1611–1621.
- Andrade, F.H., Vega, C.R.C., Uhart, S., Cirilo, A., Cantarero, M., Valentinuz, O. 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Sci.* 39, 453–459.
- Austin, D.F., Lee, M. 1998. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. *Crop Sci.* 38, 1296-1308.
- Balint-Kurti, P.J., Zwonitzer, J.C., Wisser, R.J., Carson, M.L., Oropeza-Rosas, M.A., Holland, J.B. and Szalma, S.J. 2007. Precise mapping of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight, caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O, and flowering time using advanced intercross maize lines. *Genetics* 176, 645–657
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B. 2004. QTL Cartographer, Version 1.17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Bernardo, R., Yu, J. 2007. Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.* 47, 1082-1090.
- Bernardo, R. 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Sci.* 48, 1649–1664.
- Beavis, W.D., Smith, O.S., Grant, D. and Fincher, R. 1994a. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F₄ progeny from maize. *Crop Sci.* 34, 882-896.
- Beavis, W.D. 1994b. The power and deceit of QTL experiments: Lessons from comparative QTL studies. P. 250-266. In *Proc. Corn Sorghum Ind. Res. Conf.*, 7-8 Dec. 1994, Chicago, IL. Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC.

- Blanc, G., Charcosset, A., Mangin, B., Gallais, A., Moreau, L. 2006. Connected populations for detecting a quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. *Theor. Appl. Genet.* 113, 206-224.
- Bolaños, J., Edmeades, G.O. 1996. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.* 48, 65–80.
- Bommert, P., Nagasawa, N. S., Jackson, D. 2013. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the FASCIATED EAR2 locus. *Nat. Genet.* 45, 334–7.
- Borrás, L., Otegui, M.E. 2001. Maize Kernel Weight Response to Post flowering Source-Sink Ratio. *Crop Sci.* 49, 1816–1822.
- Borrás, L., Slafer, G.A., Otegui, M.E. 2004. Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Res.* 86, 131–146.
- Borrás, L., Westgate, M.E., Astini, J.P., Echarte, L. 2007. Coupling time to silking with plant growth rate in maize. *Field Crops Res.* 102, 73-85.
- Borrás, L., Astini, J.P., Westgate, M.E., Severini, A. 2009. Modeling anthesis to silking in maize using a plant biomass framework. *Crop Sci.* 49, 937-948.
- Bruce, W.B., Edmeades, G.O., Barker, T.C. 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 13-25.
- Cabrera-Bosquet, L., Crossa, J., von Zitzewitz, J., Serret, M.D., Araus, J.L. 2012. High-throughput phenotyping and genomic selection: the frontiers of crop breeding converge. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 312–320.
- Campos, H., Cooper, M., Habben, J. E., Edmeades, G. O., Schussler, J. R. 2004. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Res.* 90, 19–34.
- Chenu, K., Chapman, S.C., Tardieu, F., McLean, G., Welcker, C., Hammer, G.L. 2009. Simulating the yield impacts of organ-level quantitative trait loci associated with drought response in maize: a “gene-to-phenotype” modeling approach. *Genetics* 183, 1507–1523.
- Chapman, S.C., Edmeades, G.O., 1999. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations. II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Sci.* 39, 1315-1324.
- Chapman, S., Cooper, M., Podlich, D., Hammer, G., 2003. Evaluating plant breeding strategies by simulating gene action and dryland environment effects. *Agron. J.* 95, 99–113

- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142, 169–196.
- Combs, E., Bernardo, R. 2013. Accuracy of genomewide selection for different traits with constant population size, heritability, and number of markers. *The Plant Genome* 6, 1–7.
- D'Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, A.G., Eyhéabide, G. 2006. Genotypic variability in morphological and physiological traits among maize inbred lines—nitrogen responses. *Crop Sci.* 46, 1266-1276
- D'Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, A.G. 2008. Kernel number determination differs among maize hybrids in response to nitrogen. *Field Crops Res.* 105, 228-239.
- D'Andrea, K. E., Otegui, M. E., Cirilo, A. G., Eyhéabide, G. H. 2009. Ecophysiological traits in maize hybrids and their parental inbred lines: Phenotyping of responses to contrasting nitrogen supply levels. *Field Crops Res.* 114, 147–158.
- D'Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, A.G, Eyhéabide, G.H. 2013. Parent–progeny relationships between maize inbreds and hybrids: Analysis of grain yield and its determinants for contrasting soil nitrogen conditions. *Crop Sci.* 53, 2147-2161.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dudley, J.W., Johnson, G.R. 2009. Epistatic models improve prediction of performance in corn. *Crop Sci.* 49, 763-770.
- Duvick, D.N. 2001. Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize. *Nat. Rev. Genet.* 2, 69-74.
- Duvick, D.N. 2005. The contribution of breeding in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86, 83–145.
- Early, E.B., McIlrath, W.O., Seif, R.D. 1967. Effects of shade applied at different stages of plant development on corn (*Zea mays* L.) production. *Crop Sci.* 7, 151-156.
- Eathington, S.R., Crosbie, T.M., Edwards, M.D., Reiter, R.S., Bull, J.K. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Sci.* 47, S154-S163.
- Echarte, L., Andrade, F.H., Vega, C.R.C., Tollenaar, M., 2004. Kernel number determination in Argentinean maize hybrids released between 1965 and 1993. *Crop Sci.* 44, 1654–661.
- Echarte, L., Tollenaar, M. 2006. Kernel set in maize hybrids and their inbred lines exposed to stress. *Crop Sci.* 46, 870-878.

- Edmeades, G.O., Daynard, T.B. 1979. The relationship between final yield and photosynthesis at flowering in individual maize plants. *Can. J. Plant Sci.* 59, 585-601.
- Fiedler, K., Bekele, W.A., Friedt, W., Snowdon, R., Stützel, H., Zacharias, A., Uptmoor, R. 2012. Genetic dissection of the temperature dependent emergence process in sorghum using a cumulative emergence model and stability parameters. *Theor. Appl. Genet.* 125, 1647-1661.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., et al. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337-342.
- Frascaroli, E., Canè, M.A., Pè, M.E., Pea, G., Morgante, M., Landi, P. 2009. QTL detection in maize testcross progenies as affected by related and unrelated testers. *Theor. Appl. Genet.* 118, 993-1004.
- Frova, C., Krajewski, P., di Fonzo, N., Villa, M., Sari-Gorla, M. 1999. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers I. Yield components. *Theor. Appl. Genet.* 99, 280-288.
- Gambín, B.L., Borrás, L., Otegui, M. 2006. Source-sink relations and kernel weight differences in maize temperate hybrids. *Field Crops Res.* 95, 316-326.
- Gambín, B.L., Borrás, L. 2008. Kernel weight dependence upon plant growth at different grain-filling stages in maize and sorghum. *Aust. J. Agr. Res.* 59, 280–290.
- Glazier, A.M., Nadeau, J.H., Aitman, T.J. 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298, 2345–9.
- Godfray, H.C.J., Garnett T. 2014. Food security and sustainable intensification. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20120273.
- Gonzalo, M., Holland, J.B., Vyn, T.J., McIntyre, L.M. 2010. Direct mapping of density response in a population of B73xMo17 recombinant inbred lines of maize (*Zea Mays* L.). *Heredity* 104, 583-599.
- Hackett, C.A. 2002. Statistical methods for QTL mapping in cereals. *Pl. Mol. Biol.* 48, 585–599.
- Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8, 299-309.
- Hallauer, A.R., Carena, M.J., Miranda Filho, J.B. 2010. Quantitative genetics in maize breeding. 3rd ed. New York: Springer.
- Hammer, G.L., Sinclair, T.R., Chapman, S.C., Van Oosterom, E. 2004. On systems thinking, systems biology, and the in silico plant. *Pl. Phys.* 134, 909–911.

- Hammer, G.L., Chapman, S., van Oosterom, E., Podlich, D.W. 2005. Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 947–960.
- Hammer, G., Cooper, M., Tardieu, F., Welch, S., Walsh, B., van Eeuwijk, F., Chapman, S., Podlich, D. 2006. Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. *Trends Plant Sci.* 11, 587-593.
- Hammer, G.L., Jordan, D.R. 2007. An integrated systems approach to crop improvement. In: Spiertz, J.H.J., Struik, P.C., van Laar, H.H. (Eds.). *Scale and complexity in plant systems research: gene–plant–crop relations*. Wageningen UR–Frontis Series N° 21. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 45–61.
- Heffner, E.L., Sorrells, M.E., Jannink, J.-L. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49, 1–12.
- Hernández, F., Amelong, A., Borrás, L. 2014. Genotypic differences among Argentinean maize hybrids in yield response to stand density. *Agron. J.* 106, 2316-2324.
- Hernandez-Valladares, M., Naessens, J., Gibson, J.P., Musoke, A.J., Nagda, S., Rihet, P., ole-MoiYoi, O.K., Iraqui, F.A. 2004. Confirmation and dissection of QTL controlling resistance to malaria in mice. *Mamm. Genome* 15, 390–398
- Holland, J.B. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr.Op. Pl. Biol.* 10, 156–61.
- Hunt, L.A., Pararajasingham, S., Jones, J.W., Hoogenboom, G., Imamura, D.T. and Ogoshi, R.M. 1993. GENECALC. Software to facilitate the use of crop models for analyzing field experiments. *Agron. J.* 85, 1090-1094.
- Hunter, J.L., Tekrony, D.M., Miles, D.F., Egli, D.B. 1991. Corn seed maturity indicators and their relationship to uptake of C-14 assimilate. *Crop Sci.* 31, 1309–1313.
- Jannink, J.-L., Lorenz, A.J., Iwata, H. 2010. Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Brief. Func. Gen.* 9, 166–177.
- Jansen, R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135, 205–211.
- Kao, C.H., Zeng, Z.B., Teasdale, R.D. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152, 1203-1216.
- Kato, T.A., Mapes, L.M., Mera, J.A., Serratos, R.A., Bye, R. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Kearsey, M.J., Pooni, H.S. 1996. *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman and Hall, London.

- Kroonenberg, P. 1995. Introduction to biplots for G× E tables. Res. Report 51.
- Lander, E.S., Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 185–99.
- Lee, M., Sharapova, N., Beavis, W.D., Grant, D., Katt, M., Blair, D., Hallauer, A. 2002. Expanding the genetic map of maize with the intermated B73 x Mo17 (IBM) population. *Plant Mol. Biol.* 48, 453-461.
- Li, Y.L., Li, X.H., Li, J.Z., Fu, J.F., Wang, Y.Z., Wei, M.G. 2009. Dent corn genetic background influences QTL detection for grain yield and yield components in high-oil maize. *Euphytica* 169, 273–284.
- Li, M., Guo, X., Zhang, M., Wang, X., Zhang, G., Tian, Y., Wang, Z. 2010. Mapping QTLs for grain yield and yield components under high and low phosphorus treatments in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci.* 178, 454–462.
- Liu, X.H., He, S.L., Zheng, Z.P., Huang, Y.B., Tan, Z.B., Wu, X. 2010. QTL identification for row number per ear and grain number per row in maize. *Maydica* 55, 127-133.
- Liu, R., Jia, H., Cao, X., Huang, J., Li, F., Tao, Y., Qiu, F., Zheng, Y., Zhang, Z. 2012. Fine mapping and candidate gene prediction of a pleiotropic quantitative trait locus for yield-related trait in *Zea mays*. *PLoS One* 7 e49836.
- Lorieux, M., 2007. Map Disto, a free user-friendly program for computing genetic maps. Computer demonstration (P958) given at the Plant and Animal Genome XV conference, Jan 13-17 2007, San Diego, CA.
- Lübberstedt, T., Klein, D., Melchinger, A.E., 1998. Comparative QTL mapping of resistance to *Ustilago maydis* across four populations of European flint-maize. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1321-1330.
- Luque, S.F., Cirilo, A.G. Otegui, M.E. 2006. Genetic gains in grain yield and related physiological attributes in Argentine maize hybrids. *Field Crops Res.* 95, 383–397.
- Maddonni, G., Otegui, M. 2004. Intra-specific competition in maize: early establishment of hierarchies among plants affects final kernel set. *Field Crops Res.* 85 1–13.
- Malosetti, M., Ribaut, J.M, Vargas, M., Crossa, J., van Eeuwijk, F.A. 2008. A multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 161, 241-257.
- McMullen, M.D., Kresovich, S., Villeda, H.S., Bradbury, P., Li, H., et al. 2009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science* 325, 737–740.
- Messina, C.D., Hammer, G., Dong, Z., Podlich, D., Cooper, M., 2009. Modelling crop improvement in a G×E×M framework via gene–trait–phenotype relationships. In: *Crop*

- physiology: interfacing with genetic improvement and agronomy. *Eds.: V. Sadras and D. Calderini. Amsterdam, Elsevier, 235–265.*
- Messina, C.D., Podlich, D., Dong, Z., Samples, M., Cooper, M. 2011. Yield-trait performance landscapes: from theory to application in breeding maize for drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 62, 855-868.
- Meuwissen, T.H., Hayes, B.J., Goddard, M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–29.
- Mikel, M.A., Dudley, J.W. 2006. Evolution of North American dent corn from public to proprietary germplasm. *Crop Sci.* 46, 1193-1205.
- Munaro, E.M., D’Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, A.G., Eyhéabide, G.H. 2011. Heterotic response for grain yield and ecophysiological related traits to nitrogen availability in maize. *Crop Sci.* 51, 1172-1187.
- Otegui, M.E. 1995. Prolificacy and grain yield components in modern argentinean maize hybrids. *Maydica* 40, 371-376.
- Otegui, M.E., Bonhomme, R. 1998. Grain yield components in maize I. Ear growth and kernel set. *Field Crops Res.* 56, 247-256.
- Pagano, E., Maddonni, G.A. 2007. Intra-specific competition in maize: Early established hierarchies differ in plant growth and biomass partitioning to the ear around silking. *Field Crops Res.* 101, 306-320.
- Peiffer, J.A., Flint-Garcia, S.A., De Leon, N., McMullen, M.D., Kaeppeler, S.M., Buckler, E.S. 2013. The genetic architecture of maize stalk strength. *PLoS ONE* 8, e67066.
- Peng, B., Li, Y., Wang, Y., Cheng, L., Liu, Z., Tan, W., Zhang, Y., Wang, D., Shi, Y., Sun, B., Song, Y., Wang, T., Li, Y. 2011. QTL analysis for yield components and kernel-related traits in maize across multi-environments. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1305-1320.
- Pollan M. 2006. *The omnivore’s dilemma: a natural history of four meals.* New York, Penguin.
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahman, M.M., Govindarajulu, Z. 1997. A modification of the test of Shapiro and Wilk for normality. *J. App. Stat.* 24, 219-235.
- Rattalino Edreira, J.I., Otegui, M.E. 2012. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: Differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. *Field Crops Res.* 130, 87–98.
- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A., Tardieu, F. 2003. Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic

- variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol.* 131, 664-675.
- Ribaut, J.M., Jiang, C., Gonzales-de-Leon, D., Edmeades, G.O., Hoisington, D.A. 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 94, 887-896.
- Rossini, M.A., Maddonni, G.A., Otegui, M.E. 2011. Inter-plant competition for resources in maize crops grown under contrasting nitrogen supply and density: Variability in plant and ear growth. *Field Crops Res.* 121, 373–380.
- Russell, W.A. 1991. Genetic improvement of maize yields. *Adv. Agron.* 46, 245–298.
- SAS Institute. 1999. The SAS Online Doc v.8. SAS Inst, Cary, NC.
- Severini, A.D. Borrás, L., Westgate, M.E., Cirilo, A.G., 2011. Kernel number and kernel weight determination in dent and popcorn maize. *Field Crops Res.* 120, 360-369.
- Schnable P.S. Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., et al., 2009. The B73 genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326, 1112-1115.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461-464.
- Slafer, G.A. 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142, 117-128.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 2, 205-233.
- Tardieu, F. 2003. Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Sci.* 8, 9-14.
- Tollenaar, M., Dwyer, L.M., Stewart, D.W., 1992. Ear and kernel formation in maize hybrids representing three decades of grain yield improvement in Ontario. *Crop Sci.* 32, 432-438.
- Tollenaar, M., Wu, J. 1999. Yield Improvement in Temperate Maize is Attributable to Greater Stress Tolerance. *Crop Sci.* 39, 1597–1604.
- Troyer, A.F., 1999. Background of U.S. hybrid corn. *Crop Sci.* 39, 601-626.
- Uptmoor, R., Schrag, T., Stützel, H., Esch, E., 2008. Crop model based QTL analysis across environments and QTL based estimation of time to floral induction and flowering in *Brassica oleracea*. *Mol. Breed.* 21, 205-216.
- Van Ooijen, J.W., 1999. LOD significance threshold for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity* 83, 613-624.
- Vega, C.R.C., Sadras, V.O., Andrade, F.H. and Uhart, S., 2000. Reproductive allometry in soybean, maize and sunflower. *Ann. Bot.* 85, 461–468.

- Vega, C.R.C., Andrade, F.H., Sadras, V.O., 2001. Reproductive partitioning and seed set efficiency in soybean, sunflower and maize. *Field Crops Res.* 72, 163-175.
- Veldboom, L.R., Lee, M. 1994. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II: Determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theor. Appl. Genet.* 89, 451-458.
- Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.B., 2010. Windows QTL Cartographer Version 2.5_004. Statistical Genetics, North Carolina State University, USA.
- Wang, Y., Li, H., Zhang, L., Lü, W., Wang, J., 2012. On the use of mathematically-derived traits in QTL mapping. *Mol. Breed.* 29, 661-673.
- Wu, W., Zhou, Y., Li, W., Mao, D., Chen, Q., 2002. Mapping of quantitative trait loci based on growth models. *Theor. Appl. Genet.* 105, 1043-1049.
- Xu, S. 2003. Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics* 165, 2259-2268.
- Yan, W., Rajcan, I., 2002. Biplot analysis of test sites and trait relations of soybean in Ontario. *Crop Sci.* 42, 11–20.
- Yin, X., Chasalow, S.D., Dourleijn, C.J., Stam, P., Kropff, M.J. 2000. Coupling estimated effects of QTLs for physiological traits to a crop growth model: predicting yield variation among recombinant inbred lines in barley. *Heredity* 85, 539-549.
- Yin, X., Struik, P.C., Kropff, M.J. 2004. Role of crop physiology in predicting gene-to-phenotype relationships. *Trends in Plant Sci.* 9, 426–32.
- Yin, X., Struik, P.C., van Eeuwijk, F.A., Stam, P., Tang, J. 2005. QTL analysis and QTL-based prediction of flowering phenology in recombinant inbred lines of barley. *J. Exp. Bot.* 56, 967-976.
- Yin, X., Struik, P.C. 2008. Applying modelling experiences from the past to shape crop systems biology: the need to converge crop physiology and functional genomics. *The New Phytologist* 179, 629–42.
- Zeng, Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136, 1457–1468.
- Zhang, L., Li, H. and Wang, J. 2012. The statistical power of inclusive composite interval mapping in detecting digenic epistasis showing common F2 segregation ratios. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 270–279.
- Zhang, G., Wang, X., Wang, B., Tian, Y., Li, M., et al. 2013. Fine mapping a major QTL for kernel number per row under different phosphorus regimes in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126, 1545–53.

APÉNDICE A

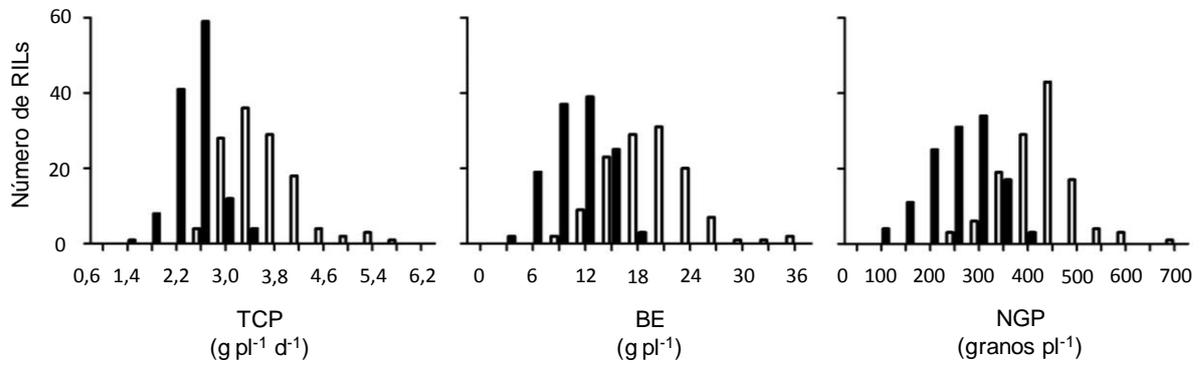


Figura 1 Frecuencia de distribución de tasa de crecimiento por planta alrededor de floración (TCP) biomasa de espigas acumulada (BE) y número de granos por planta (NGP) para las 125 RILs evaluadas de la población IBM Syn4 (B73 x Mo17). Las barras vacías corresponden al Exp. I y las barras llenas corresponden al Exp. II.

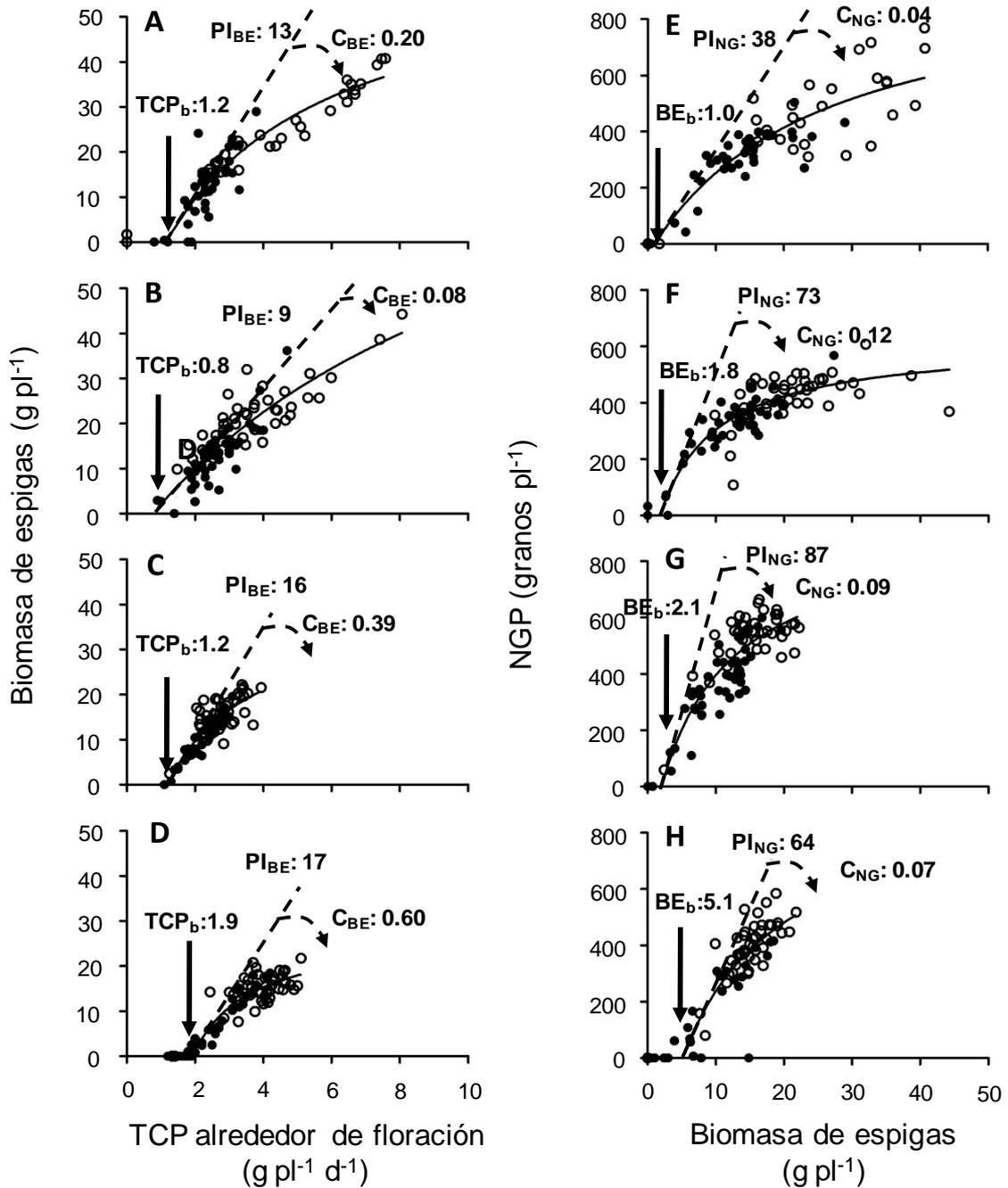


Figura 2. Ejemplo de curvas de modelo ecofisiológico con los valores de los parámetros para cuatro RILs. Las Figuras **A** y **E** corresponden a la RIL IBM28; **B** y **F** a IBM101; **C** y **G** a IBM157 y **D** y **H** a IBM270. Las Figuras **A**, **B**, **C** y **D** describen la respuesta de la biomasa de espigas (BE) a la tasa de crecimiento (TCP) ($n=90$). Las Figuras **E**, **F**, **G** y **H** describen la respuesta del número de granos por planta (NGP) a BE ($n=90$). Los parámetros del modelo son: umbral de la TCP a partir del cual hay BE (TCP_b , pendiente inicial (PI_{BE}) y curvatura (C_{BE}) de BE vs. TCP, umbral de BE para la fijación de NGP (BE_b), pendiente inicial (PI_{NG}) y curvatura (C_{NG}) para la relación de NGP vs. BE. Los círculos blancos corresponden al Exp. I y los negros corresponden al Exp. II.

Tabla 1 Correlaciones entre los BLUPs de los valores genotípicos de los parámetros del modelo ecofisiológico, biomasa de espigas (BE) y número de granos por planta (NGP).

	TCP _b	PI _{BE}	C _{BE}	BE _b	PI _{NG}	C _{NG}	BE	NGP
TCP _b	-							
PI _{BE}	-0.66***	-						
C _{BE}	0.52***	-0.81***	-					
BE _b	ns	ns	ns	-				
PI _{NG}	ns	ns	ns	-0.71***	-			
C _{NG}	ns	ns	ns	0.49***	-0.87***	-		
BE	ns	-0.26**	ns	ns	ns	ns	-	
NGP	-0.19*	ns	ns	-0.19*	ns	ns	0.66***	-

^ans: no significativo (p>0,05); *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Cálculo de correlación genética

$$r_G = \sigma_g xy / \sqrt{(\sigma_g^2 x \sigma_g^2 y)} \quad [8]$$

r_G representa la correlación genética entre las variables x e y , $\sigma_g xy$ representa la covarianza genética de las variables x e y , y $\sigma_g^2 x$ y $\sigma_g^2 y$ representan las varianzas genéticas de x e y , respectivamente (Kearsey y Pooni, 1996).

Tabla 2 Correlaciones genéticas entre número de granos por planta (NGP), biomasa de espiga (BE), tasa de crecimiento por planta alrededor de floración (TCP), coeficiente de variación de TCP (TCP_{CV}) y porcentaje de esterilidad.

	NGP	BE	TCP	TCP _{CV}	Esterilidad
BE	0,73****a				
TCP	ns	0,36****			
TCP _{CV}	-0,20**	ns	0,16*		
Esterilidad	-0,84****	-0,63****	ns	0,24**	
TCP _b	-0,35****	-0,31****	0,25**	-0,75****	0,32****

^ans: no significativo (p>0,05); * p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,001.