



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

**BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL PESO DE
GRANO EN MAÍZ**

Ing. Agr. Santiago Alvarez Prado

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. Lucas Borrás

CO-DIRECTOR: Dr. César G. López

2014

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL PESO DE GRANO EN MAÍZ

Santiago Alvarez Prado
Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires

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 ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el grupo de investigación en manejo y utilización de cultivos extensivos (GIMUCE) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y, bajo la dirección del Dr. Lucas Borrás.

Ing. Agr. Santiago Alvarez Prado
Doctorando

Dr. Lucas Borrás
Director

Dr. César G. López
Co-director

Defendida: de 20_____.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le quiero agradecer a mi familia (mis viejos y mis hermanos) y a flor por bancarme en todo momento con esta decisión y durante este tiempo. Es mucho más fácil seguir un camino cuando uno es apoyado por la gente que quiere.

En segundo lugar, quisiera agradecer a Daniel J. Miralles, ya que fue él quien me inculco el interés por seguir este camino. Los dos años trabajando en su grupo fueron claves para darme cuenta que esto era lo que me apasionaba.

También le quiero agradecer a Lucas Borrás por haber confiado en mí hace cinco años y por haberme transmitido una serie de valores que me hicieron crecer personal y profesionalmente. Entre ellos me gustaría destacar la motivación constante, el sacrificio/entrega y la dinámica para hacer las cosas.

Estos años se me pasaron muy rápidamente gracias al ambiente laboral donde me desarrollé. Gracias a Agustina Amelong, mi amiga y co-equiper en el campo durante los veranos y en la oficina durante el resto del año. Gracias a Brenda L. Gambín (Nicks) y a José L. Rotundo (Turbina) por su buena onda y la motivación constante que me transmitieron.

Quiero agradecer a todo el grupo de trabajo: Santi Tamagno, Gabi Santachiara, Bebu Hernández, Giuli Gizzi, Flor Spagnolli, Mati de Felipe, Roy Bueno, Flor Poeta, José Gerde y Guido di Mauro. Gracias al clima laboral que generan se hace muy fácil el día a día.

También quisiera agradecer a otras personas que no son parte del grupo pero que colaboraron en mi formación tanto personal como profesional. Gracias a Salvador Incognito y a César López por su constante buena onda y por sus consejos.

No puedo olvidarme de todos los pasantes rentados o PPP que me ayudaron con los muestreos de granos durante todos los veranos. Sin ellos, no hubiera podido tomar la cantidad de datos para llevar a cabo esta tesis.

A su vez, quisiera agradecer a la gente de la cátedra de Genética, a Silvina Felitti, Celina Beltrán, a la gente de Nidera, a Víctor Abertondo y a Patricio Mayor por atender mis constantes consultas con suma paciencia. También quiero agradecer a mis compañeros de sala de becarios con quienes compartí mis horas de computadora.

Gracias a mis amigos de toda la vida por las sucesivas visitas a Rosario. Eso me ayudó a no sentirme tan sólo durante los primeros años de doctorado.

Por último quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR, a la escuela de posgrado y sus autoridades, a la Agencia de Ciencia y Tecnología y al CONICET.

Gracias a todos!!

DEDICATORIA

A mis viejos, mis hermanos y al gordo.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS.
 - **Alvarez Prado S.**, Gambín B.L., Novoa A.D., Foster D., Senior M.L., Zinselmeier C., Otegui M.E., Borrás L. 2013. Correlations between parental inbred lines and derived hybrid performance for grain filling traits in maize. Crop Science53: 1636-1645.
 - **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 the IBM (B73 x Mo17) Syn4 population. Field Crops Research 145: 33-43.

- PUBLICACIONES EN CONGRESOS
 - **Alvarez Prado S.**, Abertondo V.J., Novoa A.D., Borrás L. Relación entre líneas parentales e híbridos derivados en la determinación del peso de grano en maíz. XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Septiembre 17, 2012. Mar del Plata, Argentina.
 - **Alvarez Prado S.**, Borrás L., Abertondo V.J., Mayor P., Zinselmeier C., Senior M.L. Caracterización fenotípica y genotípica del peso de grano en seis poblaciones de RILs de maíz. IX Congreso Nacional de Maíz y I Simposio Nacional de Sorgo. Noviembre 17, 2010. Rosario, Argentina.
 - **Alvarez Prado S.**, Borrás L., López C.G., Gambín B.L. Bases genéticas de la determinación del peso de grano en una población de RILs de maíz. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Septiembre 26, 2010. La Plata, Argentina.

- PRESENTACIONES ORALES EN REUNIONES CIENTÍFICAS
 - **Alvarez Prado S.**, López C.G., Gambín B.L., Abertondo V.J., Borrás L. Dissecting the genetic basis of kernel weight determination in maize. Julio 30, 2010. Workshop: Physiological and Genetic Bases of Grain Yield Determination in Wheat and Maize. Buenos Aires, Argentina.
 - **Alvarez Prado S.**, Borrás L., López C.G., Gambín B.L., Otegui M.E. Bases genéticas (QTLs) de la determinación del peso de grano en una población de RILs (B73 x Mo17) de maíz. Noviembre 19, 2010. IX Congreso Nacional de Maíz. I Simposio Nacional de Sorgo. Rosario, Argentina.

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL PESO DE GRANO EN MAÍZ

INDICE

Abreviaturas, símbolos y anglicismos	V
Resumen	VII
Abstract	VIII
Capítulo I: Introducción general	1
El maíz (<i>Zea mays</i> L.) y su producción en Argentina	1
Generación del rendimiento en grano	2
<i>Determinación del peso individual del grano a nivel de planta y canopeo</i>	3
<i>Peso potencial y tasa de crecimiento de los granos</i>	4
<i>Duración del período de llenado</i>	4
Escalas de trabajo	6
QTL: concepto	6
Identificación de QTL sobre un modelo ecofisiológico	7
Aplicación en híbridos	10
Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos e hipótesis de trabajo	12
Capítulo II: Disección de la base genética de los procesos fisiológicos que determinan el peso de grano en maíz usando la población IBM (B73 x Mo17) Syn4	14
Introducción	14
Hipótesis	17
Objetivos específicos	17
Materiales y métodos	18
Material vegetal utilizado	18
Diseño experimental y experimentos a campo	18
Mediciones fenotípicas	19
Análisis fenotípico	21
Construcción del mapa genético	24
Análisis de QTL multi-carácter multi-ambiente	24

Genes candidatos	26
Resultados	27
Resultados fenotípicos	27
Estimación de heredabilidad	31
Detección de QTL	31
Genes candidatos asociados a los QTL	32
Discusión	36
Conclusiones	41

Capítulo III: Correlación entre líneas parentales e híbridos derivados para caracteres de llenado de grano en maíz

	42
Introducción	42
Hipótesis	44
Objetivo específico	44
Materiales y métodos	45
Material vegetal	45
Experimentos a campo	45
Mediciones fenotípicas	46
Análisis estadístico	48
Resultados	50
Variabilidad fenotípica	50
<i>Experimento 1</i>	50
<i>Experimento 2</i>	51
<i>Experimento 3</i>	54
Heterosis	56
Discusión	58
Conclusiones	61

Capítulo IV: Discusión general

Contrastes de hipótesis planteadas	66
<i>Hipótesis1: Las regiones genómicas responsables de cambios en la tasa de llenado de granos son distintas de aquellas asociadas a la duración de llenado</i>	66

<i>Hipótesis 2: Cambios en la tasa de llenado están explicadas por las mismas regiones genómicas que explican los cambios en el máximo contenido de agua</i>	67
<i>Hipótesis 3: Las regiones genómicas vinculadas a cambios en la duración de llenado serán las mismas que se relacionen con la tasa de desecación de los granos y/o el porcentaje de humedad a madurez fisiológica</i>	67
<i>Hipótesis 4: Dentro de los intervalos de confianza generados por los QTL detectados para crecimiento de grano existirán genes relacionados con los procesos de división y diferenciación celular.</i>	68
<i>Hipótesis 5: Existe una alta correlación entre los desempeños de líneas parentales e híbridos derivados debida a una relativamente alta heredabilidad que muestran los caracteres de llenado</i>	69
Investigaciones futuras	71
Conclusiones finales	73
Referencias	65

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ACG: aptitud combinatoria general.

ACE: aptitud combinatoria específica.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

BIC: “Bayesian Information Criterion”. Criterio de información bayesiana.

BLAST: “Basic local alignment search tool”. Herramienta de búsqueda de alineamientos de secuencias básicas.

BLUP: “Best linear unbiased predictor”. Mejor predictor lineal insesgado.

°C: grados centígrados.

CA: contenido de agua.

C-A: Caracter-ambiente.

CH: concentración de humedad en grano.

cM: centimorgan.

DLL: duración de llenado de granos.

EE: error estándar.

Ex-PVP: “Ex Plant Variety Protection”. Ex variedad de planta protegida.

FA1: factor analítico de primer orden.

H²: heredabilidad en sentido amplio.

HMF: humedad a madurez fisiológica.

HPM: Heterosis parental media.

IBM: “Intermated B73 x Mo17”.

LOD: logaritmo de Odds.

m: metro.

Maize GDB: “Maize Gene Data Base”. Base de datos genéticos de maíz.

MCA: máximo contenido de agua.

MHD: media del híbrido derivado.

MFS: “Major Facilitator Superfamily”. Familia de transportadores de azúcares.

mm: milímetros.

NIL: “Near isogenic lines”. Líneas isogénicas.

PCV: prueba del cociente de la verosimilitud.

PG: peso de grano.

PP: parental promedio.

RIL: “Recombinant inbred line”. Línea recombinante.

Stepwise: análisis de regresión por etapas.

TD: tasa de desecación.

TLL: tasa de llenado.

tn: toneladas.

TT: tiempo térmico.

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

Wild type: Genotipo control o salvaje.

BASES GENÉTICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL PESO DE GRANO EN MAÍZ

Resumen

El rendimiento del maíz se encuentra determinado por el número y peso individual de los granos cosechados por unidad de área. Si bien el número de granos tiene más impacto sobre el rendimiento final, cambios en el peso individual de los granos (PG) impactan sobre el mismo. Existe gran variabilidad genotípica en el patrón de crecimiento de los granos de maíz de híbridos comerciales y en líneas elite de mejoramiento. El conocimiento de las bases genéticas de los procesos fisiológicos que determinan el PG es relevante para mejorar el rendimiento del cultivo. Los objetivos generales de esta tesis fueron (i) caracterizar fenotípicamente una población de RILs de maíz para características de llenado de granos, y (ii) realizar una primera aproximación a las bases genéticas que determinan el peso de grano en una población de RILs de maíz.

Se realizó un análisis de QTL sobre una población de 245RILs de maíz de la población IBM Syn4 (B73 x Mo17) que mostró grandes diferencias genotípicas en PG ($p < 0,001$) en dos ambientes. La variabilidad en PG estuvo positivamente asociada a variaciones en tasa de llenado (TLL) y duración de llenado (DLL). Un total de 10 QTL conjuntos fueron detectados, mostrando generalmente efectos menores y no consistentes a través de los dos ambientes evaluados. La TLL y DLL no mostraron QTL en común, sugiriendo un control genético independiente. A través de información de uno de los dos padres de la población de RILs los intervalos de confianza de los principales QTL se presentan posibles genes candidatos para futuras disecciones. También se evaluó la correlación entre líneas parentales e híbridos derivados para caracteres de llenado de grano. Tanto la heterosis como la correlación entre el valor medio de las líneas parentales y los híbridos derivados fueron significativas para todos los caracteres de llenado evaluados. Estos resultados confirman que el estudio de caracteres de llenado de grano en líneas endocriadas genera información valiosa para sus híbridos derivados.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la relación entre las bases genéticas del crecimiento del grano de maíz y sus mecanismos fisiológicos. Los resultados observados en líneas endocriadas son relevantes para estimar el comportamiento de sus híbridos derivados gracias a la alta correlación que se encontró en el desempeño entre ambos.

GENETIC BASIS OF KERNEL WEIGHT DETERMINATION IN MAIZE

Abstract

Grain yield in maize and other crops is determined by both kernel number per unit land area and individual kernel weight (KW). Although kernel number is usually the component explaining most yield variations, both components affect final yield. Individual KW is largely genetically determined, and its variability is achieved through different combinations of rate and duration of kernel growth. Genetic variability for grain-filling patterns has been observed among inbred lines and commercial hybrids. However, little is known about the genetic control of KW and its component traits: kernel growth rate (KGR) and grain-filling duration (GFD). The main objectives of this thesis were (i) to phenotype a maize RIL population for grain-filling patterns, and (ii) to conduct a study to determine the genetic basis of kernel weight in this population.

A QTL analysis was carried out over 245 RILs from the IBM Syn4 (B73 x Mo17) population which showed ample genotypic differences in KW ($p < 0.001$) under two environments. Kernel weight was positively associated with variation in KGR and GFD. A total of ten joint QTL were detected, generally showing inconsistent and minor effects throughout environments. Some QTL showed consistent effects through environments. Both KGR and GFD showed no common consistent QTL, supporting previous observations on independent physiological control. With the use of B73 sequence data, candidate genes were identified within marker intervals and discussed relevant candidate ones for future dissection. The correlation between parental inbred lines and derived hybrids for grain-filling traits was also evaluated. Heterosis values and genetic correlations between midparental value and hybrid performance were significant for all traits. These results confirm that studying inbred lines for grain-filling traits generates valuable information for derived hybrid performance.

Results from this thesis showed the relationship between the genetic basis of maize kernel growth and its physiological mechanisms. Observed results in parental inbred lines showed to be relevant for estimation of derived hybrid performance due to the high correlation between them.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz (*Zea mays* L.) y su producción en Argentina

El género *Zea* pertenece a la familia Poaceae que comprende más de 600 géneros. La especie cultivada es el *Zea mays* L. ssp. *mays*, originaria de México. Esta especie es sembrada en una gran variedad de regiones agroecológicas, que van desde cero metros de altitud hasta cerca de 4000 metros sobre el nivel del mar. Se cultiva desde el Ecuador hasta altas latitudes en los dos hemisferios y con distintos regímenes pluviales (desde menos de 400 hasta 3000 mm anuales) (Kato et al., 2009).

La producción del maíz es una de las principales producciones de la república Argentina detrás de la soja. La producción nacional de maíz ha mostrado un comportamiento creciente pero irregular entre los años 1970 y 2012 (Fig. I.1). En las décadas del 70 y 80 mostró un promedio de ocho millones y medio de toneladas. En la década del 90, la producción experimentó un crecimiento constante, llegando a producirse 22,5 millones de toneladas (2007) aumentando el rendimiento promedio a ocho tn ha⁻¹.

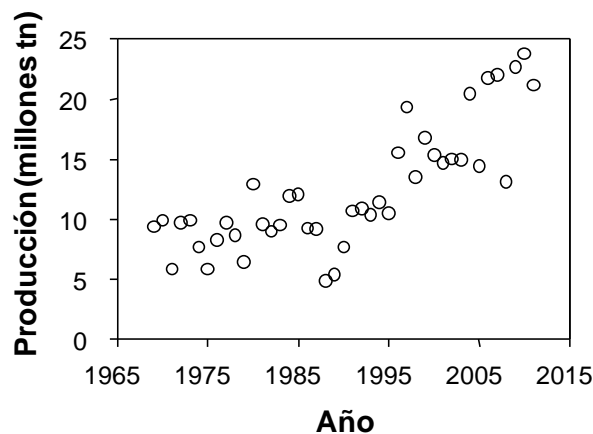


Figura I.1: Evolución de la producción anual de maíz en la Argentina para el período 1969-2012.

Actualmente, Argentina es el cuarto productor mundial de maíz luego de EE.UU., China y Brasil, con un promedio en los últimos cinco años de 20,5 millones de toneladas (FAO, 2013). El aumento en la producción anual de maíz estuvo explicado por aumentos

en el rendimiento promedio, el cual presentó una tasa de aumento de $118 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, sin observarse grandes cambios en la superficie sembrada (Fig. I.2; MinAgri, 2013).

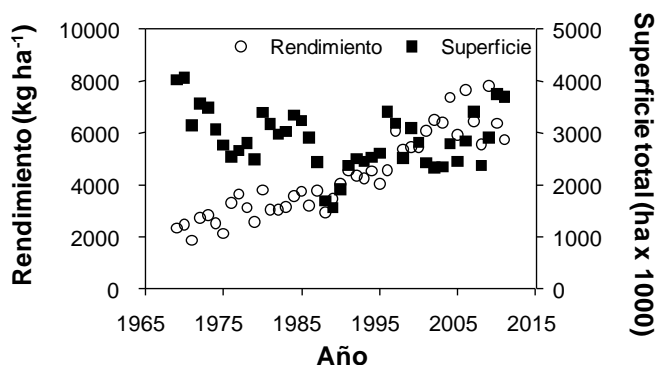


Figura I.2: Evolución del rendimiento en grano por unidad de superficie y de la superficie cosechada anual de maíz para el período 1969-2012.

Generación del rendimiento en grano

Tanto el rendimiento del maíz como el del resto de los cultivos extensivos se encuentran determinados por el número y peso individual de los granos cosechados por unidad de área a madurez. El número de granos ha mostrado ser el componente más variable y determinante del rendimiento final (Early et al., 1967; Fischer, 1975), aunque cambios en el peso individual de los granos (PG) también tienen un alto impacto sobre el mismo. Entender cuál es la base de variaciones en estos componentes del rendimiento es crítico para el manejo y el mejoramiento de los cultivos. El uso del genotipo adecuado es actualmente la principal práctica de manejo que el productor puede tomar como mecanismo de reducción del riesgo económico en la producción comercial de maíz frente a cambios climáticos (Chavas et al., 2001).

Existe una gran diversidad en cuanto a la generación del rendimiento por parte de distintos genotipos cuando éste es dividido en sus dos componentes, número y peso individual de granos (Otegui, 1995). Existe también una gran variabilidad genotípica en el patrón de crecimiento de los granos de maíz en híbridos comerciales que actualmente se cultivan en la Argentina (Gambín et al, 2007), y en líneas elite de programas de mejoramiento actuales (Borrás et al., 2009). Los genotipos de uso actual en situaciones de producción comercial y sus líneas progenitoras muestran que el mismo peso de grano puede ser alcanzado por una alta tasa durante un período corto de llenado, o bien con una baja tasa durante un período de llenado prolongado. Actualmente se desconocen las

bases genéticas que gobiernan estas variaciones.

Determinación del peso individual del grano a nivel de planta y canopeo.

La acumulación de biomasa en los granos puede considerarse como la sucesión de tres etapas (Bewley y Black, 1985). La primera, denominada fase *lag*, es una etapa de lenta acumulación de biomasa y tiene lugar durante ca. 12-15 días a partir de la fecundación del ovario (Maddonni et al., 1998). Está caracterizada por una activa división celular, donde quedan establecidos el número de células endospermáticas y de amiloplastos involucrados en la posterior deposición de almidón. Esta etapa es considerada crítica en la definición del peso de grano potencial (Brocklehurst, 1977; Capitano et al., 1983; Reddy y Daynard, 1983; Borrás y Westgate, 2006; Borrás y Gambín, 2010). La segunda etapa de crecimiento del grano, llamada de llenado efectivo, se caracteriza por una activa acumulación de reservas en el grano. El momento en el cual los granos alcanzan su máximo peso seco se conoce como madurez fisiológica, y representa el final del llenado efectivo. Durante la última etapa los granos pierden humedad, con mayor o menor velocidad dependiendo del ambiente circundante (Sala et al., 2006).

La determinación del peso de los granos puede considerarse como dependiente (i) del potencial establecido tempranamente en el desarrollo del grano, y (ii) de la capacidad del cultivo de lograr posteriormente este potencial. Estudios recientes en maíz, donde se modificó la cantidad de asimilados por grano después de las primeras etapas del llenado, muestran que aumentar la cantidad de asimilados por grano no aumenta el peso de grano en forma significativa, mientras que disminuciones de la cantidad de asimilados por grano sí disminuyen marcadamente el peso (Borrás et al., 2004). Esto significa que, si no existe un stress muy importante durante el llenado efectivo, variaciones en el peso de grano final en esta especie resultan de variaciones en el peso de grano potencial definido en las primeras etapas del llenado (Borrás y Gambín, 2010).

Por simplificación, el crecimiento de los granos ha sido generalmente dividido en dos componentes fisiológicos: la tasa de crecimiento del grano durante la fase de llenado efectivo y la duración del llenado de los granos, que abarca la fase *lag* y la fase de llenado efectivo. Esta división es de suma utilidad, ya que actualmente se reconoce que los factores que controlan la tasa no son los mismos que los que modulan la duración del llenado. Borrás et al. (2009) han mostrado que existe una fuerte variabilidad en tasa y duración del llenado efectivo entre líneas endocriadas de maíz públicas y elite de programas de mejoramiento actuales, y que no existe relación alguna entre estas dos

variables. Actualmente, los híbridos comerciales argentinos difieren marcadamente en su peso final de grano a través de variaciones tanto en la tasa de llenado como en la duración del período de llenado (Gambín et al., 2006 y 2007). Sin embargo, no se conocen qué regiones genómicas asociadas a la determinación de estos caracteres. Considerando que en términos fisiológicos estos caracteres no están correlacionados, hipotetizamos que las regiones genómicas asociadas a cada carácter son distintas.

Las relaciones hídricas del grano han tomado recientemente una gran importancia para mejorar el entendimiento del crecimiento de los granos. Esto se debe a que los granos acumulan agua antes que biomasa, y a que ambos patrones de acumulación muestran una estrecha relación (Borrás y Gambín, 2010). Diferentes parámetros asociados con las relaciones hídricas del grano permiten predecir y conectar la potencialidad del peso del grano con sus componentes fisiológicos. De esta forma, creemos que las regiones genómicas asociadas a los caracteres hídricos serán las mismas que para los componentes fisiológicos a los cuales están correlacionados.

Peso potencial y tasa de crecimiento de los granos

El peso potencial del grano está estrechamente relacionado con el número de células endospermáticas que se establecen temprano en el desarrollo del mismo (Reddy y Daynard, 1983; Capitano et al., 1983). Un mayor número de células endospermáticas indica una mayor cantidad de sitios potenciales para la posterior acumulación de almidón. Cambios en las condiciones ambientales en las cuales crecen los granos durante las primeras etapas de su desarrollo, afectan el PG potencial a través de modificaciones en el número de células endospermáticas (Jones et al., 1996; Setter y Flannigan, 2001). Cambios en el peso de grano potencial normalmente se ven reflejados en cambios en la tasa de llenado (Jones et al., 1985). Recientemente se demostró que el contenido de agua del grano en sus etapas tempranas de desarrollo también puede ser utilizado como un estimador del peso potencial del grano (Borrás y Westgate, 2006) ya que el mismo se encuentra altamente correlacionado con la tasa de llenado de los granos. El uso del contenido de agua como un estimador del peso potencial del grano nos permite estudiar variaciones en el peso potencial en un alto número de individuos y ambientes debido a la facilidad y rapidez de su medición, y a su robustez a través de un amplio rango de diversidad genotípica en maíz (Borrás et al., 2009).

Duración del período de llenado

La duración del llenado de los granos de maíz tiene un fuerte componente genético, y estaría asociada a la velocidad de maduración del endosperma (Gambín et al., 2007) y al momento, expresado como porcentaje de humedad, en el cual los granos dejan de acumular biomasa (Gambín y Borrás, 2005). La velocidad de maduración puede ser fácilmente estudiada por los cambios en las relaciones hídricas de los granos, ya que desde su fecundación hasta madurez fisiológica el grano se deseca progresivamente (contenido de agua relativo al peso fresco total; Saini y Westgate, 2000; Borrás et al., 2003; Borrás y Westgate, 2006). En cuanto al momento en el cual los granos dejan de acumular biomasa, genotipos que llegan a madurez fisiológica con un mayor porcentaje de humedad acumularán biomasa por menos tiempo que aquellos que llegan a madurez fisiológica con menor porcentaje de humedad. En sorgo se encontraron diferencias en el porcentaje de humedad a madurez fisiológica que estuvieron negativamente asociados con la duración del período de llenado de granos (Gambín y Borrás 2005).

Además del efecto universal de la temperatura sobre la duración del período de llenado, otros factores del ambiente modifican la extensión de esta etapa. Reducciones en la cantidad de asimilados por grano (producidos por un stress hídrico, una defoliación o reducidos niveles de radiación) durante el período de llenado efectivo aceleran la normal desecación del grano, disminuyendo la duración de la etapa de llenado. Cuando esto sucede al final del ciclo, el grano puede no alcanzar el peso potencial establecido tempranamente. Por el contrario, aumentos en la cantidad de asimilados no han mostrado efectos sobre la duración del llenado en maíz (Jones y Simmons, 1983), y esto difiere de lo observado en otros cultivos como soja (Egli, 1990) o sorgo (Gambín y Borrás, 2007).

Diferencias en la duración del llenado entre genotipos comerciales también pudieron ser descritas en forma simple a través de la velocidad con la que los granos van perdiendo humedad (Gambín et al., 2007). Este comportamiento se pudo establecer para un conjunto de 13 genotipos comerciales argentinos que mostraban una variación de la duración de la etapa entre floración y madurez fisiológica de 1117 a 1470 °Cdía (temperatura base 0 °C, alrededor de 12-14 días calendario aprox. de diferencia). Los genotipos no difirieron en el porcentaje de humedad a madurez fisiológica o en el momento en el cual los granos alcanzaron el máximo contenido de agua. Las diferencias genotípicas en duración del llenado estuvieron asociadas a diferencias en la velocidad de desecación de los granos hacia el fin de la etapa de llenado, después de alcanzarse el máximo contenido de agua (Gambín et al., 2007). Así, estudiar la progresión del porcentaje de humedad permite describir el desarrollo de los granos en forma simple. Y,

debido a esta gran simplicidad, es posible estudiar la velocidad con la cual los granos se desarrollan en un elevado número de genotipos. Parámetros como la tasa de desecación del grano pueden ser potencialmente claves para estudiar y modelar diferencias genotípicas y ambientales en la determinación de la duración del llenado.

Escalas de trabajo

Los programas de mejoramiento, combinados con un buen manejo agronómico, han logrado aumentar los rendimientos de los cultivos de grano de forma exitosa durante las últimas décadas. Sin embargo, en la actualidad, el aumento de los rendimientos se ha visto detenido en comparación con la creciente demanda mundial de alimentos (Cassman, 1999). Para solucionar este inconveniente no es suficiente trabajar a escala de cultivo, como se ha hecho hasta hace poco, sino que es necesario explorar escalas de detalle aún mayores. En este sentido resulta de vital importancia que el estudio de los mecanismos genéticos a nivel de planta individual alcancen la escala de cultivo (Hammer et al., 2004). De esta forma podrán contribuir con el aumento en la producción de alimentos y el suplemento de energía al facilitar el entendimiento más acabado de los procesos que determinan el comportamiento de los cultivos (Yin y Struik, 2008).

Existen dos formas de investigar un determinado problema generando interacción con otras escalas de detalle: el “bottom-up” y el “top-down”. En el primer caso, se parte de una escala de mayor detalle (*gen*) hacia otra de menor detalle (*cultivo*). En este sentido, Rivero et al. (2007) manipularon el gen de la enzima isopenteniltransferasa para generar tolerancia a sequía en plantas de tabaco. En el segundo caso, se realiza el mecanismo inverso, partiendo de una escala de menor detalle (*cultivo*) hacia otra de mayor detalle (*gen*). Existen sobrados ejemplos de este método, en el cual se parte de un carácter de importancia agronómica de un cultivo y se realiza la detección de regiones genómicas asociados a ese carácter (Austin & Lee, 1998; Uauy et al, 2006; Gonzalo et al, 2010). Una vez identificada la región de interés, el siguiente paso consiste en refinar esa región genómica de forma tal de achicar el número de genes candidatos involucrados en la determinación del carácter. Luego, se debe seleccionar uno o varios genes candidatos que estén fisiológicamente relacionados con el carácter de interés, y finalmente se deben realizar pruebas funcionales de ese o esos genes a través del silenciamiento o sobre-expresión de los mismos (Glazier et al., 2012).

QTL: concepto

En los últimos años se han producido importantes avances en el desarrollo de la genética molecular. Esto ha conducido a la integración de nuevas herramientas (marcadores moleculares) que permiten estudiar variabilidad genética independientemente de variaciones ambientales. Esta herramienta ha sido, y es, utilizada para el estudio de muchos rasgos de importancia agronómica. Sin embargo su utilidad ha sido moderada ya que los atributos que determinan estos caracteres (rendimiento en grano, calidad de aceite, etc.) en los cultivos de grano están controlados por muchos genes que contribuyen con una pequeña parte al fenotipo total y son conocidos como rasgos cuantitativos (Collard et al., 2005). A su vez, estos caracteres de interés están influenciados por el ambiente, lo que da lugar a que la distribución de fenotipos se aproxime a una curva con distribución normal. Este tipo de caracteres se dice que presentan variación continua, cuantitativa o métrica (Jones et al., 1997). Por su parte, el tipo de herencia se denomina poligenética o cuantitativa, y responde a un modelo aditivo en el que cada locus añade una cierta cantidad al fenotipo (si asumimos que no hay interacción entre genes o epistasis). Por lo tanto, el control genético de caracteres continuos estaría atribuido a “loci de caracteres cuantitativos” o QTL, que son regiones del genoma que contienen genes individuales o grupos de genes que codifican o influyen caracteres complejos y están localizados en el mismo o distinto/s cromosoma/s. Son difíciles de identificar debido a la ausencia de segregación genotípica observable y a que los efectos genotípicos de cada gen asociado con un carácter complejo son relativamente pequeños (Collard et al., 2005).

Para la identificación de QTL en primer lugar se deben detectar “polimorfismos”, que son diferencias en la secuencia del ADN generadas por cambios puntuales, pequeñas y grandes inserciones y deleciones, re-arreglos cromosómicos, apareamiento desigual y errores de la ADN polimerasa. Estas diferencias se conocen como marcadores moleculares y se visualizan como bandas, fragmentos o amplicones en los geles de corrida electroforética. Luego de la detección de marcadores moleculares, se confeccionan mapas de ligamiento que indican la posición del marcador en un cromosoma determinado y la distancia a la cual se encuentra respecto al resto de los marcadores. Estos, conjuntamente con información fenotípica, son utilizados para la identificación de regiones cromosómicas asociadas a caracteres simples y caracteres cuantitativos, que son interpretados a través del análisis de QTL (Collard et al. 2005).

Identificación de QTL sobre un modelo eco-fisiológico

La detección de QTL para interpretar rasgos agronómicos recibió una considerable atención en genética vegetal desde fines de los 80, con el objetivo de entender las bases genéticas de los distintos caracteres de interés (Blanc, et al. 2006). Una de las primeras cuestiones a tener en cuenta es la elección del carácter que se desea evaluar. El mismo debe ser un carácter heredable, donde las variaciones fenotípicas estén mayormente explicadas por variaciones genotípicas y en menor medida por variaciones relacionadas con el ambiente (Kearsey y Pooni, 1996).

Tardieu y Tuberosa (2010) sostienen que para obtener resultados consistentes entre ambientes es conveniente disectar el carácter a evaluar en sus componentes determinantes debido a que presentan mayor heredabilidad. Estudiando la tasa de elongación de las hojas de maíz Reymond et al. (2003) demostraron que el análisis genético debe realizarse no sobre el producto final (en su estudio particular sobre elongación de hoja) sino sobre los procesos fisiológicos que conforman este producto final, y como estos son modificados independientemente por el ambiente. Estos autores demostraron que haciendo un análisis de QTL sobre los procesos que están detrás de la determinación del producto final pudieron predecir su fenotipo (tasa de elongación de la hoja) a partir de datos genotípicos para un amplio rango de condiciones ambientales.

En esta tesis doctoral el carácter bajo estudio es el peso de grano de maíz, que presenta altos valores de heredabilidad. Algunos autores reportaron valores entre 0.61 y 0.92 (ver Sadras 2007). Sobre este carácter altamente heredable se realizó una disección en sus componentes determinantes, tasa y duración del llenado. A su vez, estos caracteres fueron estudiados en función de la dinámica hídrica del llenado. La tasa de llenado fue entendida en función del máximo contenido de agua que alcanzan los granos; mientras que la duración del llenado fue estudiada en función de la tasa de desecación y del porcentaje de humedad a madurez fisiológica de los granos. El análisis de QTL fue aplicado sobre este modelo conceptual. Siguiendo esta aproximación en sorgo, Gambín y Borrás (2011) no observaron aumentos en la heredabilidad al disectar el carácter peso de grano en sus componentes fisiológicos tasa y duración. Este resultado difiere de lo propuesto por Tardieu y Tuberosa (2010) y lo observado por Reymond et al. (2003) sugiriendo que existen excepciones a esta teoría. Este resultado podría estar asociado a una posible compensación entre los componentes fisiológicos para la determinación del peso de grano sustentado por la relación negativa observada entre tasa y duración de llenado para las líneas de sorgo evaluadas. Sin embargo, es indudable que a medida que se disecta un carácter en sus componentes fisiológicos se reduce la cantidad de genes

involucrados, aumentando la precisión del estudio independientemente de la heredabilidad del carácter.

Si bien trabajar con caracteres cuantitativos resulta complejo, hay evidencias en la literatura de la existencia de QTL para peso de grano en maíz. Los resultados muestran una gran variabilidad en la ubicación de los QTL detectados para este carácter (Schön et al., 1994; Austin y Lee, 1996, 1998; Berke y Rocheford, 1995; Frova et al., 1999; Li et al, 2007, 2011; Messmer et al., 2009; Peng et al., 2011; Guo et al., 2011). De hecho, agrupando trabajos que estudien la base genética del peso de grano se puede observar que se detectaron QTL distribuidos a lo largo de los diez cromosomas del maíz. En líneas generales se puede decir que la mayor cantidad de QTL para el carácter peso de grano en maíz fueron detectados en los cromosomas 1, 2 y 7. Sin embargo, la mayoría de estos QTL detectados resultaron inestables en otros ambientes. Por otro lado, algunos trabajos estudiaron la base genética de la tasa de llenado de grano en maíz (Liu et al., 2011; Li et al., 2012). Al igual que para peso de grano, los QTL de tasa de llenado fueron inestables, o sea que no se repitieron al modificar el ambiente. La interacción QTL x ambiente es un problema bastante común a lo largo de la bibliografía revisada. Por ejemplo, Austin y Lee (1998) detectaron 18 QTL asociados al peso de grano en una población de maíz, de los cuales 5 fueron validados en dos ambientes distintos (con y sin estrés). Por otro lado, en muchos trabajos se detectaron QTL para el carácter peso de grano en maíz, pero pocos los han logrado validar entre ambientes (Li, 2005; Schön et al, 1994; Austin and Lee, 1996; Li et al, 2007; Berke and Rocheford, 1995). Por ejemplo, Austin y Lee (1998) evaluaron PG en una población de RILs en un ambiente bajo estrés y otro sin estrés. Los autores detectaron 67 QTL, de los cuales 7 QTL (13%) fueron estables entre ambientes. Por su parte, Schön et al. (1994) evaluaron PG en dos ambientes. Los autores detectaron 7 QTL en un ambiente de los cuales 4 fueron detectados en el ambiente restante. Por último, Liu et al. (2011) evaluaron la tasa de llenado en una población de RILs creciendo en dos localidades y repetidos en dos años consecutivos. Los autores detectaron 23 QTL de los cuales sólo 5 fueron estables a través de ambientes. La inestabilidad de los QTL detectados estuvo asociada a la falta de protocolos adecuados para la medición de caracteres fisiológicos ya que los autores no estudiaron la tasa de llenado en base al tiempo térmico generando variaciones en el carácter al modificar el ambiente. Esto aumenta la interacción QTL x ambiente y por lo tanto lleva a la elaboración de conclusiones erróneas. Muchos otros trabajos presentan problemas en el análisis estadístico de los datos ya que no respetan los postulados de los análisis estadísticos que aplican. Por ejemplo, consideran que las variancias ambientales son iguales o que no

existen correlaciones entre caracteres cuando en realidad esto ocurre con alta frecuencia (Liu et al., 2011).

Aplicación en híbridos

La mayoría de los trabajos donde se realiza la detección de QTL para caracteres de interés consisten en fenotipar y genotipar una o más poblaciones de mapeo, y realizar un análisis de asociación fenotipo-genotipo. Son pocos los trabajos que luego de esta aproximación continúan trabajando sobre los QTL detectados o se preguntan si lo que observan en líneas se traduce en híbridos, que son los que finalmente se utilizan para la producción y comercialización. En programas de mejoramiento, generalmente el desempeño de las líneas parentales es utilizado como criterio de selección para resistencia a enfermedades, tiempo a floración, altura de planta, y otros caracteres altamente heredables (Mihaljevic et al., 2005). Para caracteres más complejos como rendimiento, número de granos, etc., se utiliza el desempeño de los cruzamientos de prueba o híbridos derivados como criterio de selección. Esto genera la necesidad de hacer numerosas pruebas que resultan costosas y consumen mucho tiempo. Sin embargo, estas pruebas resultan necesarias ya que cualquier evaluación fenotípica sobre líneas endocriadas tiene poco valor si su desempeño no se correlaciona con el desempeño de sus híbridos derivados (Hallauer y Miranda, 1988). En caso de existir una baja correlación fenotípica entre las líneas parentales y sus híbridos derivados, la detección de QTL para peso de grano y/o sus componentes fisiológicos no será relevante ya que estos no se manifestarán en el híbrido derivado. Por otro lado, cuando se trabaja en mapeo de QTL se asume que las regiones que modifican el carácter de interés presentan efectos aditivos y en algunos casos de dominancia. La comparación de líneas parentales con sus híbridos derivados permite desglosar los componentes de la variancia génica con el objetivo de entender que líneas parentales aportan un efecto aditivo positivo a su progenie. A su vez, permite diferenciar que caracteres expresa heterosis cuando pasamos de una línea a un híbrido. Esto resulta de gran interés debido a que conocer el modo de herencia de los caracteres y la performance de las líneas parentales permite dirigir cruzamientos específicos con el objetivo de mejorar el carácter de interés.

Hallauer y Miranda (1988) realizaron una revisión de trabajos donde se evaluaron caracteres agronómicos sobre líneas e híbridos derivados. En general, los autores observaron una baja correlación entre el desempeño de las líneas y sus híbridos. Caracteres como rendimiento, número de granos, prolificidad, etc., son caracteres muy

influenciados por el ambiente y por lo tanto, de baja heredabilidad. Resultados similares fueron obtenidos por Kebede et al. (2013), quienes evaluaron la correlación entre líneas parentales e híbridos derivados para el carácter rendimiento en condiciones de estrés hídrico y de buena provisión hídrica en siete ambientes. Como se esperaba, los autores observaron una baja correlación entre el rendimiento de líneas parentales y el de los híbridos derivados, que aumentó levemente cuando mayor fue el estrés hídrico. Caracteres estables que permitan predecir lo que pasa en los híbridos con sólo evaluar sus líneas parentales permitirá reducir la cantidad de pruebas de cruzamiento y por lo tanto los costos del fenotipeado. En este sentido, tanto el peso de grano como sus componentes fisiológicos resultan de interés ya que son caracteres estables, o sea que presentan altos valores de heredabilidad (Sadras, 2007; Gambín y Borrás, 2011).

El presente trabajo de tesis pretende identificar determinantes genéticas de los diferentes patrones de crecimiento de grano en maíz. La variabilidad genotípica en la respuesta se estudiará en la población de líneas endocriadas recombinantes entrecruzadas (RILs) IBM Syn4 generada a partir del cruzamiento de las líneas parentales B73 y Mo17, dos líneas de gran trascendencia en el mejoramiento del cultivo de maíz en Estados Unidos (Troyer, 1999). Los individuos de la población (245 genotipos) fueron sometidos a 4 ciclos de recombinación al azar luego de la F₂ (Lee et al. 2002), lo que genera un aumento en el número de meiosis y por lo tanto un aumento en la variabilidad de las líneas. A su vez, esta población cuenta con una amplia base de datos moleculares disponible en el Maize Gene Data Base (www.maizegdb.org). Considerando la mayor cantidad de ciclos de recombinación respecto a una población de RILs tradicional, la amplia base de datos moleculares, su disponibilidad y su variabilidad en peso de grano (Abertondo, 2007) se decidió utilizar esta población para la caracterización fenotípica y la identificación de QTL asociados a los caracteres de llenado.

Luego se estudiará la correlación entre líneas parentales e híbridos derivados para los caracteres del llenado de grano con el fin de evaluar la relevancia del estudio sobre líneas endocriadas. Para ello se utilizaron tres sets de cruzamientos dialélicos provenientes de distintos fondos genéticos correspondientes a germoplasma de interés para programas de mejoramiento con el fin de ampliar la variabilidad genotípica explorada respecto de una población de RILs. El aumento de la variabilidad genotípica explorada viene dado por el uso de líneas de distinta procedencia con distinta historia de mejoramiento. De esta forma estaríamos evaluando una mayor cantidad de alelos que en el caso de la población de RILs IBM Syn4.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Realizar una primera aproximación a las bases genéticas que determinan el peso de grano en maíz.

Objetivos específicos e hipótesis de trabajo:

Objetivos específicos

- 1- Realizar una caracterización fenotípica para peso de grano final y sus componentes (tasa y duración de llenado) en la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17).
- 2- Realizar un análisis de QTL para peso de grano final y sus componentes determinantes (tasa y duración de llenado).
- 3- Estudiar la correlaciones existentes entre tasa y duración de llenado con algunos mecanismos fisiológicos relacionados al status hídrico de los granos durante su desarrollo para la población de RILs,
 - a. Tasa de llenado de granos como respuesta al máximo contenido de agua que alcanzan los mismos a mitad de llenado,
 - b. Duración del llenado como una respuesta a la velocidad con la que se secan los granos y al momento en el cual se corta el llenado.
- 4- Sugerir posibles genes candidatos para cada carácter de llenado de grano utilizando los QTL detectados.
- 5- Evaluar la correlación entre el desempeño de líneas parentales e híbridos derivados para los caracteres de llenado estudiados.

Hipótesis específicas

1. Las regiones genómicas responsables de cambios en la tasa de llenado de grano son distintas de aquellas asociadas a la duración de llenado.
2. Cambios en la tasa de llenado están explicados por las mismas regiones genómicas que explican los cambios en el máximo contenido de agua.
3. Las regiones genómicas vinculadas a cambios en la duración del llenado serán las

mismas que se relacionen con la tasa de desecación de los granos y/o el porcentaje de humedad a madurez fisiológica.

4. Dentro de los intervalos de confianza generados por los QTL detectados para crecimiento de grano existirán genes relacionados con los procesos de división y diferenciación celular.
5. El comportamiento de las líneas parentales se transmite a sus híbridos derivados para caracteres de llenado.

CAPÍTULO II:

DISECCIÓN DE LA BASE GENÉTICA DE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS QUE DETERMINAN EL PESO GRANO EN MAÍZ USANDO LA POBLACIÓN IBM (B73 x Mo17) SYN4.

Introducción

El rendimiento en grano de maíz está determinado por el número de granos cosechados y su peso individual (PG). Generalmente, el número de granos es más variable y está mayormente correlacionado con el rendimiento que el PG. Sin embargo, para un número de granos determinado existe un amplio rango de rendimientos alcanzables debido a variaciones en el PG (Borrás y Gambín, 2010). Existen diversos estudios ambientales y fisiológicos asociados a la determinación del PG en distintas escalas como cultivo, planta, tejido y molecular. No obstante, existe poca información acerca de la integración de estas escalas de organización de forma tal de poder dilucidar la arquitectura genética del PG. La detección de regiones genómicas asociadas a loci de caracteres cuantitativos (QTL) relevantes para los procesos fisiológicos que ocurren en el grano de maíz es de gran interés ya que proveen oportunidades para realizar disecciones genéticas específicas (Lande y Thompson, 1990). A su vez, pueden proporcionar información útil para el mejoramiento del cultivo de maíz en caso de ser consistentes a través de ambientes y contextos genéticos (Eathington et al., 2007).

El desarrollo de los granos es clásicamente particionado en tres fases: la fase *lag*, el período de llenado efectivo de los granos y la fase de maduración (Bewley y Black, 1985). La fase *lag* es un período de activa división celular. Se caracteriza por un rápido incremento del contenido de agua ($\text{mg agua grano}^{-1}$) con relativamente escasa acumulación de materia seca. Luego de la fase *lag* sigue un período de rápida acumulación de materia seca asociada a la diferenciación celular y a la deposición de reservas. Esta fase es conocida como el llenado efectivo de los granos. Al igual que en la fase *lag* el contenido de agua continúa aumentando a una alta tasa durante el llenado efectivo de los granos y eventualmente se establece el máximo volumen del grano (Gambín et al., 2007). Luego, los granos de maíz se someten a una pérdida neta de agua, alcanzan madurez fisiológica (máximo peso seco del grano), y entran en un estado de quiescencia (Bewley y Black, 1985). La concentración de humedad en el grano (en base húmeda) declina a lo largo de las

tres fases de desarrollo. Esta reducción del contenido de humedad es más notoria después de que los granos alcanzan madurez fisiológica, pero también ocurre durante el período de acumulación de agua a una alta tasa (Borrás et al., 2003).

Dos procesos distintos son responsables de variaciones en el PG final del maíz: la tasa de llenado de granos (TLL) y la duración de llenado de granos (DLL). A pesar de que ambos procesos afectan el PG, es generalmente la TLL quien mayor impacta sobre las diferencias en PG (Borrás y Gambín, 2010). La TLL está estrechamente relacionada con el máximo contenido de agua (MCA) y refleja el potencial del grano como destino de asimilados, el cual fue establecido durante la fase *lag*. La DLL está correlacionada con la tasa de desecación (TD) desde la polinización hasta madurez fisiológica, y con la concentración de humedad a la cual los granos dejan de acumular reservas (i.e. alcanzan madurez fisiológica, HMF). Una TD más elevada y/o una mayor HMF tienden a reducir la DLL. La estrecha coordinación entre la acumulación de biomasa seca y la acumulación de agua en maíz es también observada en otros cultivos de grano como soja (Swank et al., 1987), trigo (Calderini et al., 2000), cebada (Bingham et al., 2007), girasol (Rondanini et al., 2009) y sorgo (Gambín y Borrás, 2005). Sin embargo, las bases genéticas de esta estrecha coordinación no han sido estudiadas.

Existen pocas evidencias sobre el control genético del crecimiento y desarrollo del grano de maíz. Se han realizado algunos estudios sobre mapeo de QTL para PG donde se detectaron QTL distribuidos a lo largo de los diez cromosomas de la especie sin mucha consistencia entre estudios (Schön et al., 1994; Austin y Lee, 1996, 1998; Frova et al., 1999; Li et al., 2007, 2012). La disección genética de caracteres complejos comúnmente muestra muchos genes con efectos relativamente pequeños, fácilmente influenciados por el ambiente y con interacciones epistáticas (Bernardo, 2008). Esta falta de consistencia puede estar relacionada con la necesidad de disectar los caracteres complejos en caracteres más simples (Slafer, 2003). El PG puede ser disectado en dos caracteres, TLL y DLL, cuya variación se sabe que es independiente y que está relacionada a distintos procesos fisiológicos (Borrás et al., 2009). Disectar el PG en estos dos caracteres simples (TLL y DLL) mejorará el entendimiento de su base genética permitiendo discriminar que procesos fisiológicos específicos están siendo afectados por las regiones asociadas a la determinación del peso de grano. Actualmente, no se sabe si la TLL y la DLL están asociados a distintas regiones del genoma en forma independiente o ligada. Por otro lado, conociendo que regiones afectan los distintos procesos fisiológicos, sumado a la amplia base de datos genéticos existente para el parental B73, será posible proponer genes candidatos que estén involucrados en la determinación de estos procesos fisiológicos. En

este sentido, Liu et al. (2008) estudiaron los perfiles de expresión génica durante el periodo de llenado de grano en maíz y observaron que durante ese periodo se expresaban alrededor de 3500 genes. Este trabajo resalta la necesidad de disectar el PG en sus componentes fisiológicos de forma tal de discriminar sobre que procesos actúan los genes que se expresan durante el llenado de granos.

El mapeo de QTL en plantas ha sido, y es, comúnmente realizado sobre una población de mapeo. La misma surge del cruzamiento entre dos líneas parentales que presentan diferencias en el carácter fenotípico que se desea evaluar (Jones et al. 1997). Distintos tipos de población de mapeo pueden ser utilizadas para la detección de QTL asociados a la determinación de un carácter fenotípico. Para especies autogamas o alogamas que se puedan autofecundar se suelen utilizar poblaciones F_2 , F_n , RILs, derivadas de retrocruzas y doble haploides. La ventaja de utilizar RILs o doble haploides es que se trata de individuos homocigota. Esto permite replicar experimentos en distintos ambientes y/o campañas sin que ocurran cambios en la conformación alélica de los individuos (Jones et al. 1997; Collard et al. 2005). Por otro lado, las poblaciones doble haploides representan la variabilidad genética entre los progenitores luego de ocurrida una sola meiosis (F_1), mientras que una población de RILs presenta por lo menos 6 ciclos de recombinación (meiosis). Sin embargo, este tipo de poblaciones presentan un limitado número de eventos de recombinación que genera una baja resolución para caracteres cuantitativos. De forma tal de incrementar la resolución de las poblaciones de mapeo, se crearon poblaciones que han atravesado un mayor número de ciclos de recombinación al azar (Lee et al. 2002). Un ejemplo concreto es la población pública IBM Syn4, la cual fue generada a partir del cruzamiento de las líneas parentales B73 y Mo17, dos líneas de gran incidencia en el mejoramiento del cultivo de maíz en Estados Unidos (Troyer, 1999). Esta población cuenta con una mayor cantidad de recombinaciones que una población de RILs tradicional, aumentando de esta forma la precisión en la detección de QTL (Lee et al. 2002).

A pesar de la gran cantidad de trabajos donde se detectan QTL para caracteres complejos como el PG en maíz, todavía es limitada la cantidad de trabajos que busquen QTL para procesos fisiológicos que puedan escalar a mayores niveles de organización y hacer frente al ambiente de crecimiento. Liu et al. (2011) y Li et al. (2012) detectaron QTL para TLL usando una población de RILs en diferentes ambientes, pero ninguno de ellos fue consistente a través de la variación ambiental. La falta de conocimientos en fisiología vegetal para generar protocolos de caracterización fenotípica, como la necesidad de estudiar el crecimiento de los granos en función del tiempo térmico en vez de hacerlo en

función de los días es crítica cuando se evalúan distintos ambientes de crecimiento. El estudio de los caracteres asociados al crecimiento del grano es importante debido a su relevancia para la predicción y entendimiento del rendimiento en el cultivo de maíz en distintos escenarios ambientales. Ambos TLL y DLL son coeficientes genéticos que determinan el PG final en modelos de crecimiento de cultivos (Jones et al., 2003).

Hipótesis

- Las regiones genómicas responsables de cambios en la tasa de llenado de grano son distintas de aquellas asociadas a la duración de llenado.
- Cambios en la tasa de llenado están explicados por las mismas regiones genómicas que explican los cambios en el contenido de agua máximo.
- Las regiones genómicas vinculadas a cambios en la duración del llenado serán las mismas que se relacionen con la tasa de desecación de los granos y/o el porcentaje de humedad a madurez fisiológica.

Objetivos específicos

- Conducir un análisis de QTL sobre los caracteres del llenado de los granos para determinar su complejidad genética.
- Estudiar las relaciones entre caracteres asociados al desarrollo del grano tanto al nivel fenotípico como genotípico.
- Dentro de los intervalos de confianza generados por los QTL detectados para crecimiento de grano existirán genes relacionados con los procesos de división y diferenciación celular.

Materiales y métodos

Material vegetal utilizado

Se utilizaron las dos líneas parentales públicas B73 y Mo17, y 245 líneas provenientes de la población de RILs IBM Syn4 (B73 x Mo17). 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 detalles correspondientes a las líneas de la población IBM se pueden encontrar en la página web de GRIN (www.ars-grin.gov; verificada el 15 de Abril de 2013). Las líneas parentales han demostrado ser relevantes para el germoplasma actual de maíces dentados (Mikel yDudley, 2006) y muestran diferencias para varios caracteres del llenado de granos (Borrás et al., 2009). Estudios previos mostraron que la población de RILs en estudio presenta una importante variación en PG (Abertondo, 2007). A su vez, esta población cuenta con una amplia base de datos moleculares disponibles en la página web del Maize Gene Data Base (www.maizegdb.org).

Diseño experimental y experimentos a campo

Los experimentos a campo fueron conducidos durante las campañas 2009/2010 (desde ahora 2009) y 2010/2011 (desde ahora 2010) en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, en Zavalla, Argentina. Para ambos experimentos se utilizó un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones. La siembra se realizó el 15 de septiembre en 2009 y el 4 de octubre en 2010. Las condiciones de crecimiento del cultivo fueron diferentes no sólo debido a los distintos años sino también a la densidad de siembra. Una densidad de cinco plantas m⁻² fue utilizada en 2009 y otra de siete plantas m⁻² en 2010. Las parcelas fueron sembradas al doble de la densidad y entre V2 y V3 se ralearon a la densidad objetivo. Cada una contó con cuatro surcos distanciados a 0,70 m y de 5,5 m de largo.

Los experimentos fueron conducidos en secano durante 2009 y con riego durante 2010. Durante el 2010 un total de 150 mm de agua fueron aplicados con un sistema de riego por aspersión durante floración y principios del llenado de grano. Las plagas y enfermedades fueron controladas con insecticidas y fungicidas comerciales recomendados para maíz, y las malezas fueron removidas periódicamente a mano. El experimento fue

fertilizado a la siembra y alrededor de V5 con un total de 150 kg N ha⁻¹. El objetivo de estas prácticas fue reducir la probabilidad de ocurrencia de estreses severos sobre el cultivo.

Mediciones fenotípicas

La materia seca y el contenido de agua en grano fueron medidos a lo largo del desarrollo del mismo, comenzando 15 días después de que el 50% de las plantas de la parcela alcancen el estado de antesis y finalizando en madurez de cosecha (15% de humedad en grano), siguiendo el procedimiento descrito en Borrás et al. (2003). Brevemente, una planta por parcela fue muestreada cada cuatro o cinco días entre las 07:00 y las 10:00 am. Una vez cosechada, la espiga junto con sus chalas fue inmediatamente guardada en una bolsa plástica herméticamente cerrada y luego transportada al laboratorio. Se muestrearon 10 granos entre las posiciones 10 a 15 contando desde la base de la espiga dentro de una caja húmeda. Una vez muestreados los 10 granos, se midió el peso fresco de la muestra y luego de secar las muestras en estufa a 70°C durante 96 horas se midió el peso seco. De la diferencia entre el peso fresco y el peso se obtuvo el contenido de agua de los granos.

La TLL y la DLL fueron determinadas para cada combinación de genotipo x repetición ajustando un modelo bi-lineal siguiendo el procedimiento de Borrás et al. (2009):

$$PG = a + b TT \quad \text{para } TT \leq c \quad (1)$$

$$PG = a + b c \quad \text{para } TT > c \quad (2)$$

donde TT es el tiempo térmico después de polinización (°C día), *a* es la intercepta (°C día), *b* es la TLL durante el período de llenado efectivo de los granos (mg °C día⁻¹), y *c* es la DLL (°C día) (Fig. 1A). Las unidades térmicas fueron calculadas usando 0 °C como temperatura base (Muchow, 1990; Borrás et al., 2009). La temperatura media diaria fue registrada en una estación climática ubicada aproximadamente a 150 m del experimento.

El MCA fue determinado para cada combinación de genotipo x repetición ajustando un modelo curvilíneo siguiendo a Borrás et al. (2009):

$$CA = d + e TT + f TT^{1.5} + g TT^2 \quad (3)$$

donde CA es el contenido de agua en el grano y *d*, *e*, *f* y *g* son los parámetros del modelo.

La HMF fue determinada usando un modelo bilineal relacionando el PG con el contenido de humedad del grano siguiendo a Borrás et al. (2009):

$$PG = h - i MC \quad \text{para } CH \geq j \quad (4)$$

$$PG = h - i MC \quad \text{para } CH < j \quad (5)$$

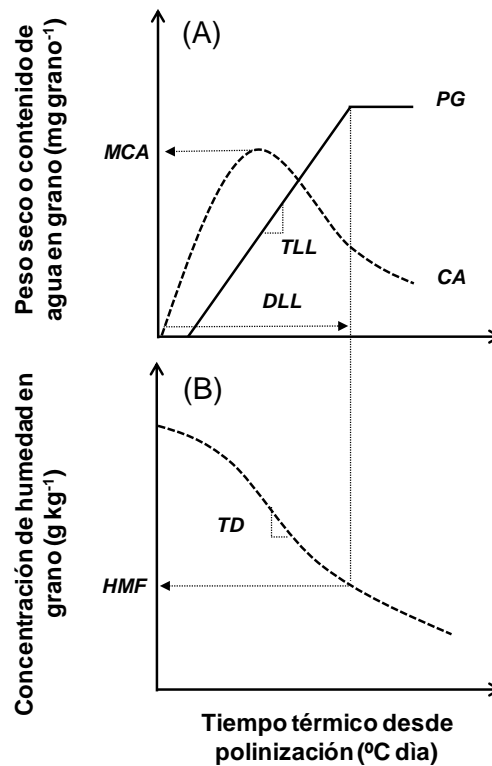


Figura II.1: Figura esquemática que describe los caracteres fenotípicos de llenado de grano: (A) peso de grano (PG), tasa de llenado de grano (TLL), duración de llenado de grano (DLL), contenido de agua (CA) y máximo contenido de agua (MCA), y (B) humedad a madurez fisiológica (HMF) y tasa de desecación durante el llenado efectivo de granos (TD). Por detalles sobre mediciones de cada carácter específico ver la sección mediciones fenotípicas.

donde CH es la concentración de humedad del grano (%), h es la intercepta (mg grano^{-1}), i es la tasa de caída en la CH del grano durante el llenado ($\text{mg grano}^{-1} [\%]^{-1}$), y j es la HMF (%). Este modelo fue ajustado para cada combinación de genotipo x repetición.

La TD fue determinada usando un modelo de regresión lineal ajustado para cada combinación de genotipo x repetición relacionando la concentración de humedad y el tiempo térmico desde polinización hasta madurez fisiológica:

$$CH = k + I TT \quad (6)$$

donde CH es la concentración de humedad en el grano (g kg^{-1}), k es la intercepta (g kg^{-1}), y I es la TD ($\text{g kg}^{-1}\text{°C día}^{-1}$) (Fig. II.1B).

Todas las curvas explicadas anteriormente fueron ajustadas usando la técnica de optimización por iteraciones del GraphPad Prism Demo v5.0 (Radushev, 2007).

Análisis fenotípico

Para poder testear la variabilidad de cada carácter en forma individual se utilizó un modelo lineal general. El modelo incluyó ambientes (años), bloques anidados en ambientes, genotipos y la interacción genotipo x ambiente. Los ambientes y los bloques anidados en ambientes fueron considerados como factores fijos mientras que los genotipos y la interacción genotipo x ambiente fueron considerados como factores aleatorios. Las medias individuales de cada genotipo fueron comparadas a través del análisis de mínimas diferencias significativas (LSD). El Proc GLM del programa estadístico SAS[®] fue utilizado para el análisis (SAS Institute, 1999).

La heredabilidad en sentido amplio de cada carácter fue calculada sobre una base media como:

$$H^2 = \sigma_G^2 / [\sigma_G^2 + (\sigma_{GE}^2 / \eta) + \sigma_e^2 / r \eta] \quad (7)$$

donde σ_G^2 es la variancia genotípica, σ_{GE}^2 es la variancia de la interacción genotipo x ambiente, σ_e^2 es la variancia residual de la parcela, y η y r son el número de ambientes y repeticiones, respectivamente (Hallauer y Miranda, 1988).

Para el análisis de QTL, la información fenotípica fue analizada utilizando un modelo mixto siguiendo a Malosetti et al. (2008). El set de datos multi-carácter multi-ambiente consistió de I genotipos, evaluados en J ambientes con mediciones sobre K caracteres repetidos en L bloques ($I = 245$, $J = 2$, $K = 6$ y $L = 3$). Se definió un vector “y” $N \times 1$, con $N = IJKL$ que contiene todas las observaciones agrupadas por carácter dentro de cada ambiente y dentro de cada genotipo para cada bloque. Dado que el interés es en la variación genética

dentro de la población más que en los genotipos *per se*, los genotipos se asumieron como aleatorios. La combinación carácter-ambiente (C-A) y los bloques anidados dentro de la combinación C-A fueron considerados como fijos. El modelo lineal mixto para la información multi-carácter multi-ambiente fue:

$$Y = X\beta + Zu + \varepsilon \quad (8)$$

donde Y es el vector de observaciones fenotípicas, β es un vector de efectos fijos debido a la combinación C-A y bloques anidados dentro de C-A, mientras que u y ε son los vectores de los efectos aleatorios debido a los genotipos y a los residuales, respectivamente. X y Z son matrices identidad de 1s y 0s asociadas con los efectos fijos y aleatorios, respectivamente. El vector β contiene las medias de los caracteres dentro de los ambientes a través de los genotipos y las medias de los bloques dentro de C-A. El vector u denota los efectos genotípicos aleatorios por cada combinación de C-A. Los efectos genotípicos aleatorios se asumen normalmente distribuidos $u \sim N(0, G)$, siendo G una matriz de bloques diagonales con 12 x 12 parámetros de variancia-covariancia. Finalmente, ε es un vector de residuales no genéticos asociados con cada observación y normalmente distribuidos $\varepsilon \sim N(0, R)$ siendo R la variancia residual (σ^2_{ijk}). La (co)variancia fenotípica fue:

$$V(y) = ZGZ' + R \quad (9)$$

Para el modelo de la ecuación (8), la matriz G contiene la variancia genética de cada C-A en su diagonal y la covariancia genética para cada par de C-A de un mismo genotipo fuera de la diagonal. Como señalaron Malosetti et al. (2008), los efectos genéticos aleatorios no serán independientes a través de ambientes si existen genes/QTL con efectos sobre esos ambientes. Además, los efectos genéticos para diferentes caracteres no serán independientes si genes/QTL para diferentes caracteres están ligados o son pleiotrópicos. Los efectos de genes/QTL a través de ambientes generalmente no tienen el mismo efecto en términos de magnitud y en algunos casos presentan el signo opuesto. A causa de esto, se asumieron distintos modelos de variancia-covariancia para la matriz G de forma tal de seleccionar el más adecuado y parsimonioso para el set de datos.

Todos los modelos estructurales consideran la combinación factorial de caracteres y ambientes como un carácter. El modelo más sencillo fue el "Componentes de variancia", el cual considera variancias homogéneas para cada C-A y ausencia de correlación entre pares de C-A (Cov = 0). En otras palabras considera que no hay QTL comunes entre ambientes ni

QTL pleiotrópicos entre caracteres (Tabla II.1). Un modelo menos sencillo es el de “Simetría compuesta” que también considera variancias homogéneas para cada C-A. Este modelo agrega un parámetro extra para modelar covariancias genéticas homogéneas entre pares de C-A. Un modelo más realista es el de “Simetría compuesta heterogénea” que presenta distintos parámetros de variancia para cada C-A, y utiliza la raíz cuadrada de estos parámetros para calcular las covariancias (Tabla II.1). Este modelo retiene la propiedad de covariancia constante a través de todos los pares de C-A. El modelo más flexible y realista es el “No estructurado” que cuenta con variancias y covariancias únicas para cada combinación de C-A. Este modelo suele ser difícil de ajustar en la práctica debido a la gran cantidad de parámetros a estimar. Una alternativa para este modelo es el “Modelo de bandas” que estima la primera banda de la matriz, estableciendo el resto de las bandas superiores iguales a cero. Tan flexible como el modelo “No estructurado”, pero que requiere menos parámetros (más parsimonioso) es el “Factor analítico de primer orden (FA1)”. Este modelo agrega un término multiplicativo, con λ_{ijk} parámetros multiplicativos específicos para C-A. Una alternativa para el FA1 es el FA0 que tiene una estructura similar al FA1 excepto que no incluye la matriz diagonal D (SAS Institute, 1999 Cary, NC).

Tabla II.1: Diferentes modelos para la matriz de variancias-covariancias (G). Se detallan el número de parámetros y el criterio de información bayesiana de cada modelo.

Modelos para la matriz G	Nº parámetros	Criterio de información bayesiano
Componentes de variancia	1	22.499,8
Simetría compuesta	2	22.306,2
Factor analítico “0”	12	22.865,7
Simetría compuesta heterogénea	13	22.331,3
Factor analítico de primer orden	24	21.725,5
Banda	78	22.503,7

Los modelos estructurales evaluados usan distinta cantidad de parámetros para ajustar la información (Tabla 1). Un mayor número de parámetros resulta en un mayor tiempo de cálculo creando dificultades en la convergencia. Para este set de datos no se pudo ajustar el modelo “No estructurado” debido a que no alcanzó el criterio de convergencia. La selección del mejor modelo estuvo basada en la bondad de ajuste del criterio de información bayesiano (de su sigla en inglés BIC) (Schwarz, 1978). Este criterio

penaliza la bondad de ajuste por el número de parámetros de variancia-covariancia que utiliza el modelo. De acuerdo a este criterio, el modelo “Factor analítico de primer orden” fue el más adecuado para este set de datos (Tabla II.1).

Considerando la mejor estructura de variancia-covariancia para la información fenotípica, se calculó el mejor predictor lineal insesgado (de su sigla en inglés BLUP) para cada genotipo en cada ambiente de forma tal de reducir el error no controlado para el mapeo de QTL (Borevitz et al., 2002; Zalapa et al., 2007).

Construcción del mapa genético

La información de los marcadores moleculares utilizada para construir el mapa de ligamiento fue obtenida del sitio web Maize GDB (<http://www.maizegdb.org>, verificada el 10 de octubre de 2012). Previo al análisis de ligamiento, se realizó un test de chi-cuadrado para verificar la distribución alélica de cada locus (Kearsey y Pooni, 1996). Aquellos marcadores que mostraban una segregación distorsiva fueron descartados del análisis. De los 1102 marcadores de ADN que segregaban de acuerdo a lo esperado, se seleccionaron 171 (dos marcadores por bin de acuerdo al mapa consenso de la población) para la construcción de un mapa de ligamiento preliminar. Se realizó un análisis de QTL para detectar los intervalos de marcadores asociados a cada carácter. El mapa final se construyó agregando 470 marcadores moleculares de la base de datos al mapa de ligamiento preliminar. Los marcadores agregados correspondían a las regiones detectadas en el análisis de QTL preliminar. Finalmente, un total de 641 marcadores de ADN fueron utilizados del mapa consenso de la población IBM Syn4. El análisis de ligamiento fue llevado a cabo usando el programa MapDisto V1.7 (Lorieux, 2007). Las distancias genéticas fueron calculadas con la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1943).

Análisis de QTL multi-carácter multi-ambiente

Los BLUPS calculados usando modelos mixtos fueron utilizados para el mapeo de QTL, pero el mapeo de QTL se realizó a través de un modelo mezcla (Jiang y Zeng, 1995) en vez de un modelo mixto. Esta decisión estuvo basada en la mayor precisión del modelo mezcla respecto del mixto, cuando se quieren localizar QTL en mapas no saturados. En modelos mezcla, el término residual del modelo es el único efecto aleatorio:

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (10)$$

donde los parámetros son iguales a los de la ecuación (8). A diferencia de los modelos mixtos, los modelos mezcla asumen que los efectos residuales ϵ_{JK} están correlacionados entre caracteres dentro de cada genotipo con covariancia $\text{Cov}(\epsilon_{JK}, \epsilon_{JL})$ y son independientes entre individuos (Jiang y Zeng, 1995). Para el análisis de verosimilitud, se asume los ϵ_{JK} s tienen una distribución normal multivariada entre individuos con media cero y con una matriz de variancia-covariancia no estructurada al igual que la descrita para la matriz G del modelo mixto.

Cuando se incluyó un QTL putativo en el modelo, este paso a ser:

$$Y = X\beta + X^{\text{QTL}}a + \epsilon \quad (11)$$

donde X^{QTL} es una matriz identidad, la cual proviene de la información de marcadores moleculares. El término a es un vector fijo con el efecto del QTL. Finalmente la extensión del modelo de un QTL al de múltiples QTL es:

$$Y = X\beta + \sum X_q^{\text{QTL}} a_q + \epsilon \quad (12)$$

Este análisis se llevó a cabo en dos pasos: (1) Un escaneo amplio del genoma con test para QTL conjuntos considerando las correlaciones entre caracteres y ambientes, y (2) un modelo final multi-QTL donde se calcularon los efectos y la significancia de cada QTL en un único modelo, y las posibles interacciones entre los mismos. Este procedimiento se realizó con el programa WinQTL Cartographer V2.5 (Wang et al., 2011). El procedimiento multi-carácter multi-ambiente, que utiliza mapeo por intervalos compuestos fue usado para el primer paso. En el mapeo por intervalos compuestos, se usó el análisis de regresión stepwise del modelo 6 del programa. Se estableció un umbral de 0,05 para el ingreso y egreso de QTL putativos para ser utilizados como cofactores. Se utilizó una ventana de 10 cM donde se removía temporalmente el efecto del marcador que se encontraba dentro de esa ventana durante el escaneo del genoma. El umbral para declarar la presencia significativa de un QTL conjunto fue de $\text{LOD} = 7$, con intervalos de escaneos de 2 cM entre el marcador y el QTL putativo. 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 paso dos. En este último paso, se

construyó un modelo multi-QTL usando el procedimiento de mapeo de múltiples caracteres en múltiples intervalos. 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 usando un LOD = 3 para caracteres individuales, buscó nuevos QTL e interacciones epistáticas, y finalmente calculó la variancia genética explicada por el modelo (Basten et al., 2004). Cada vez que el modelo fue refinado se realizó la prueba del cociente de la verosimilitud para determinar si el cambio en el modelo era significativo:

$$PCV = 2(\log L_1 - \log L_0) \quad (13)$$

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.

Genes candidatos

Se realizó una búsqueda de genes candidatos de los intervalos donde se detectaron los QTL que formaron parte del modelo final. La opción "Locus Pair Lookup" del buscador genético del Maize GBD (www.maizegdb.org; verificada el 29 de agosto de 2012) (Andorf et al., 2010) fue utilizado para la información de secuencia B73 RefGen_v2 (Schnable et al., 2009). Los genes de la base de datos "Filtered Gene Set and Working Gene Set [de MaizeSequence.org]" o "5b60 genome build" fueron seleccionados para la búsqueda. Las secuencias resultantes de cada gen fueron sistemáticamente buscadas usando BLASTn (Atschul et al., 1990) para la expresión de fragmentos de secuencia con un umbral esperado de 0,01. Los genes candidatos fueron seleccionados cuando el valor e era $\leq e^{-20}$ para *Zea mays* L. Los productos de los genes fueron buscados en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; verificada el 29 de agosto del 2012), y fueron identificados de acuerdo a la homología con genes previamente caracterizados usando un umbral de identidad del 70% para las especies *Zea mays* L., *Oryza sativa* o *Arabidopsis thaliana*.

Resultados

Resultados fenotípicos

Los genotipos de la población de RILs mostraron estrechas diferencias en el tiempo a antesis. El tiempo térmico acumulado desde la siembra hasta la primera y la última línea florecida fue de 824 a 923 °C día (equivalente 12 días para las líneas más extremas) en 2009. El rango de tiempo térmico acumulado durante el 2010 fue de 894 a 1191 °C día (equivalente 17 días). Esta estrecha diferencia permitió que las líneas de la población de RILs comenzaran el período de llenado de granos en condiciones ambientales similares en ambos años.

Se observaron diferencias en el PG final de las líneas parentales ($p < 0,001$) donde los granos de Mo17 fueron más pesados que los de B73 en ambas condiciones ambientales (Tabla II.2). Se observaron diferencias para el PG a través de la población de RILs ($p < 0,0001$), que fueron desde 166 a 338 mg grano⁻¹ y de 129 a 305 mg grano⁻¹ para 2009 y 2010, respectivamente (Tabla II.2). También se detectaron efectos ambientales significativos ($p < 0,001$) y una interacción genotipo x ambiente ($p < 0,001$) indicando un cambio de ranking para los genotipos ante distintos ambientes. El PG promedio fue 253 mg grano⁻¹ y 226 mg grano⁻¹ en 2009 y 2010, respectivamente.

Comparando las líneas parentales, Mo17 mostró una TLL más alta que B73 en ambos ambientes ($p < 0,001$; Tabla II.2). Se observaron diferencias genotípicas y ambientales para TLL en esta población de RILs ($p < 0,001$) que fueron desde 0,23 a 0,57 mg °C día y de 0,21 a 0,53 mg °C día en 2009 y 2010, respectivamente (Tabla II.2). El PG estuvo positivamente correlacionado con la TLL ($r = 0,79$), donde los genotipos con mayor TLL mostraron PG mayores (Fig. II.2A).

Tabla II.2: Peso de grano, tasa de llenado, duración de llenado, máximo contenido de agua, tasa de desecación y humedad a madurez fisiológica de las líneas parentales (B73 y Mo17) y promedio, máximo y mínimo de 245 RILs de la población IBM Syn4 en dos ambientes diferentes (2009 y 2010). Se detallan los coeficientes de variación (CV) y la heredabilidad (H^2) de cada carácter.

Ambiente	Genotipo	Peso de grano	Tasa de llenado	Duración de llenado	Máximo contenido de agua	Tasa de desecación	Humedad a madurez fisiológica
		mg grano ⁻¹	mg °Cdía ⁻¹	°Cdía	mg grano ⁻¹	g kg ⁻¹ °Cdía ⁻¹	%
2009	B73	252	0,40	940	203	0,67	39
	Mo17	312	0,46	965	263	0,70	37
	IBM	253	0,39	942	220	0,68	39
	IBM mín.	166	0,23	761	133	0,53	25
	IBM max.	338	0,57	1152	315	0,83	54
2010	B73	203	0,30	974	169	0,64	41
	Mo17	252	0,43	902	239	0,75	43
	IBM	226	0,36	950	205	0,69	41
	IBM mín.	129	0,21	755	117	0,46	28
	IBM max.	305	0,53	1177	307	0,89	59
CV (%)		6,5	13,2	7,6	6,8	11,2	10,8
H^2		0,81	0,70	0,53	0,91	0,47	0,57
G		*** (15) [†]	*** (0,05)	*** (69)	*** (14)	*** (0,07)	*** (4)
A		*** (57)	*** (0,18)	* (263)	*** (53)	*** (0,27)	*** (17)
G x A		*** (15)	*** (0,05)	*** (69)	*** (14)	*** (0,07)	*** (4)

* Significativo para $p < 0,05$

** Significativo para $p < 0,01$

*** Significativo para $p < 0,001$

[†]valores de LSD para $p \leq 0,05$

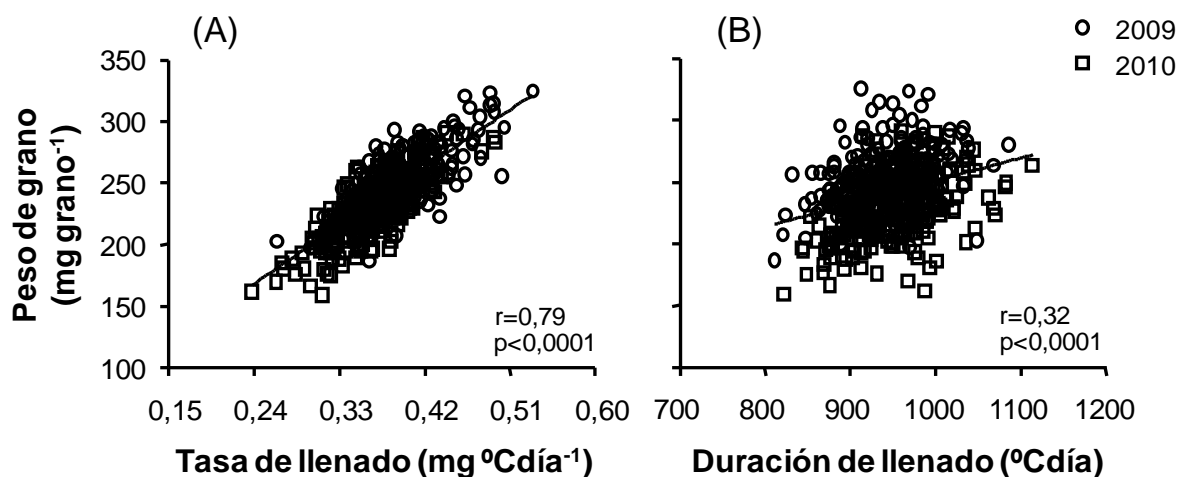


Figura II.2: Relación entre el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) del peso de grano y (A) tasa de llenado de grano, y (B) duración de llenado de grano de las 245 RILs en dos ambientes de crecimiento. Los valores corresponden a la campaña 2009 (círculos) y 2010 (cuadrados).

En cuanto a la DLL, el desempeño de los parentales se modificó entre años. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$), Mo17 mostró una DLL más larga que B73 durante el 2009 y más corta durante el 2010. Se observaron diferencias significativas dentro de la población de RILs en ambos ambientes ($p<0,001$), que fueron desde 761 a 1152 °C día y desde 755 a 1177 °C día en 2009 y 2010, respectivamente (Tabla 2). Se detectó una alta interacción genotipo x ambiente ($p<0,001$). La DLL y el PG estuvieron positivamente correlacionados (Fig. II.2B). A pesar de ser significativa, los caracteres presentaron una baja correlación ($r = 0,32$).

La línea parental Mo17 alcanzó un MCA a mitad del llenado mayor que B73 (Tabla II.2). Los genotipos de la población de RILs también mostraron diferencias en el MCA alcanzado a mitad del llenado ($p<0,001$). El rango observado fue desde 133 a 315 mg agua grano⁻¹ y de 117 a 307 mg agua grano⁻¹ en 2009 y 2010, respectivamente (Tabla II.2), evidenciando diferencias genotípicas significativas en los patrones de acumulación de agua en los granos ($p<0,001$). También se detectaron efectos ambientales y de la interacción genotipo x ambiente ($p<0,001$). Como se esperaba de estudios previos, los genotipos con mayor MCA correlacionaron con una mayor TLL (Fig. II.3).

Aunque no hubo diferencias significativas, la línea parental Mo17 mostró una mayor TD que B73 en ambos ambientes (Tabla II.2). Dentro de la población de RILs, la TD durante el llenado mostró un rango de variación desde 0,53 a 0,83 g kg⁻¹°C día⁻¹ y desde 0,46 a 0,89 g kg⁻¹°C día⁻¹ en 2009 y 2010, respectivamente (Tabla II.2). La DLL no mostró correlación con la TD durante el período de llenado efectivo (Fig. II.4A).

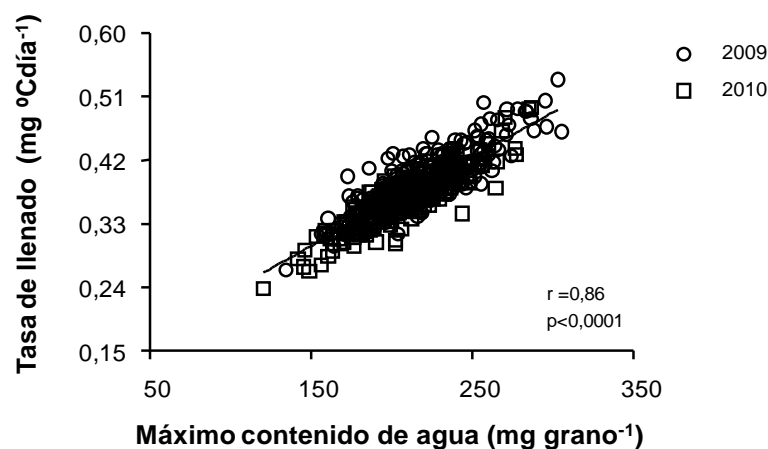


Figura II.3: Relación entre el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) de la tasa de llenado y el máximo contenido de agua de las 245 RILs en distintos ambientes de crecimiento. Los valores corresponden a la campaña 2009 (círculos) y 2010 (cuadrados).

Al igual que para la TD, la HMF de las líneas parentales no mostró diferencias estadísticas ($p > 0,05$). En este caso, Mo17 siempre mostró mayor HMF que B73 (Tabla II.2). La HMF observada en la población de RILs mostró diferencias genotípicas significativas ($p < 0,01$), que fueron desde 25 a 54 % y desde 28 a 59 % en 2009 y 2010, respectivamente (Tabla II.2). La HMF estuvo negativamente correlacionada ($r = -0,45$) con la DLL (Fig. II.4B).

En resumen, todos los caracteres fenotípicos evaluados mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$) y una segregación transgresiva consistente ($p < 0,05$). Esto ayudó a la generación de una amplia variabilidad para cada carácter fenotípico.

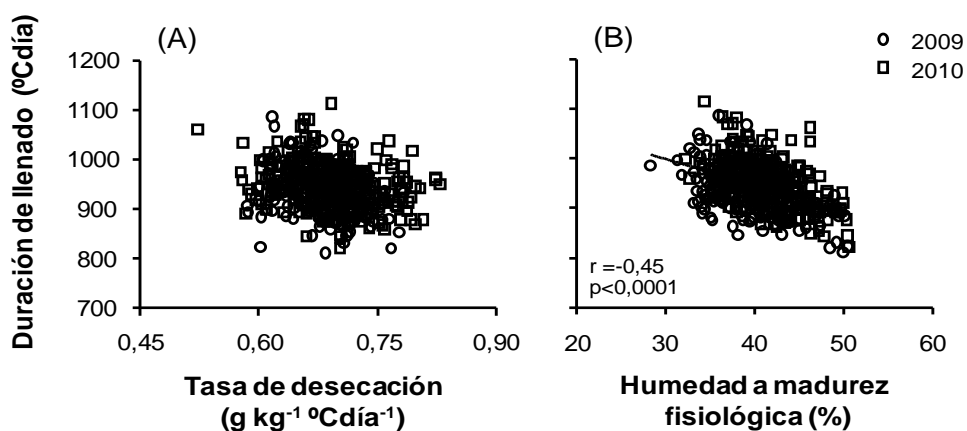


Figura II.4: Relación entre el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) de la duración de llenado y (A) tasa de desecación, y (B) humedad a madurez fisiológica de las 245 RILs en dos ambientes de crecimiento. Los valores corresponden a la campaña 2009 (círculos) y 2010 (cuadrados).

Estimación de heredabilidad

Todos los caracteres estudiados mostraron coeficientes de variación menores a 15 % (Tabla II.2), permitiendo generar estimaciones precisas de la heredabilidad del carácter. El PG mostró una alta heredabilidad en sentido amplio (0,81), la cual fue mayor que la de sus componentes TLL (0,70) y DLL (0,53) (Tabla II.2). El MCA fue el carácter de llenado de granos que presentó la mayor heredabilidad en sentido amplio (0,91), mayor aún que la del PG y la TLL (Tabla II.2). La heredabilidad de la TD y la HMF fue de 0,47 y 0,57, respectivamente, similar a la observada para la DLL (Tabla II.2).

Detección de QTL

En una primera instancia se identificaron diez QTL conjuntos localizados en ocho de los diez cromosomas del genoma de maíz (Fig. II.5). Las diez posiciones detectadas en el análisis conjunto fueron consideradas como QTL candidatos y constituyeron el punto de partida para la generación del modelo final de multi-QTL (segundo paso del procedimiento). Ninguno de los QTL candidatos fue eliminado cuando formaron parte de dicho modelo. Tampoco se detectaron nuevos QTL para este modelo ni interacciones epistáticas que fueran significativas. Por lo tanto, el modelo final de multi-QTL para caracteres de llenado de granos consistió de diez QTL localizados en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Nueve de los diez QTL estuvieron asociados a PG, ocho a TLL, siete QTL asociados a la DLL, diez QTL asociados a el MCA, cuatro QTL asociados a la HMF y tres QTL afectaron la TD. La Fig. 5 describe la magnitud de los efectos aditivos para la presencia del alelo Mo17 para cada QTL sobre cada carácter en cada ambiente.

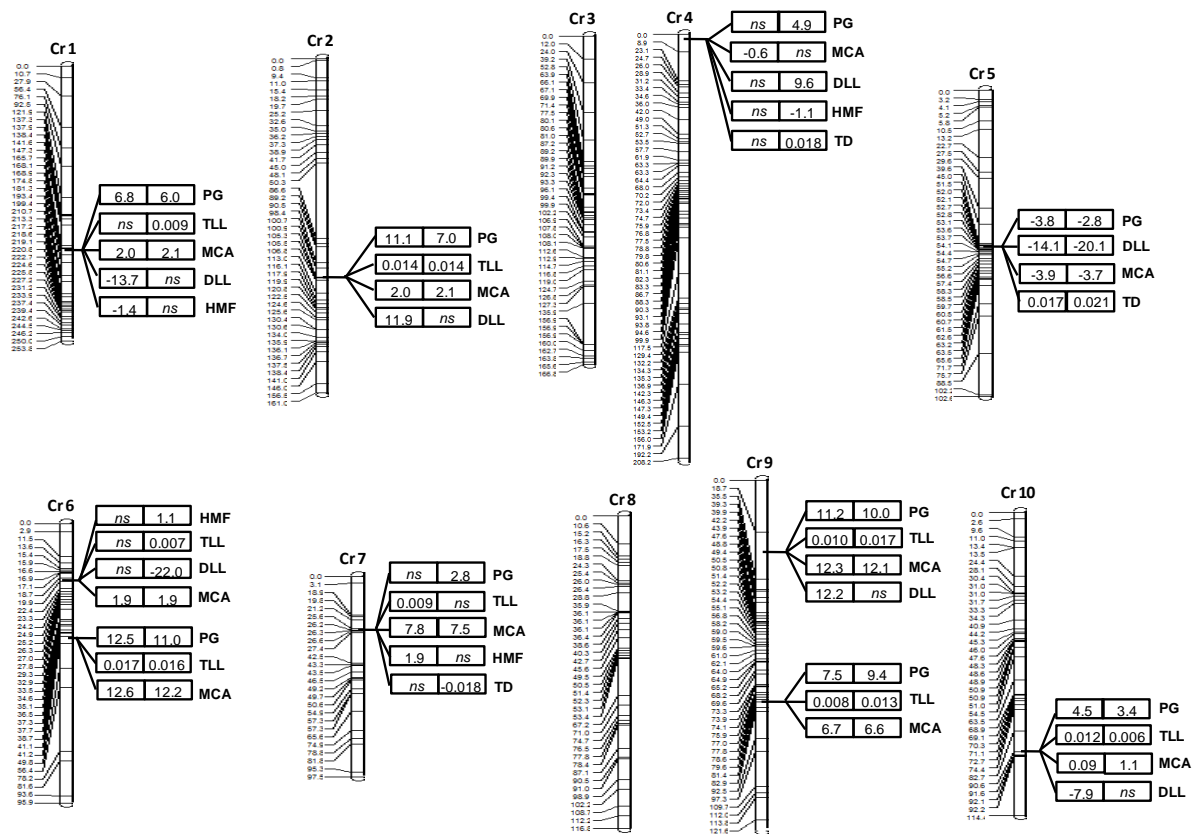


Figura II.5: Localización cromosómica de QTL detectados para peso de grano (PG), tasa de llenado (TLL), duración de llenado (DLL), máximo contenido de agua (MCA), humedad a madurez fisiológica (HMF) y tasa de desecación (TD). Los QTL están presentados en barras con un conector que indica la posición en el cromosoma. Los dos bloques de cada barra muestran el efecto aditivo del alelo en cada ambiente (2009 a la izquierda y 2010 a la derecha). Los efectos aditivos corresponden a la presencia del alelo Mo17.

La mayoría de los QTL detectados mostraron efectos inconsistentes a través de ambientes posiblemente asociado con la interacción genotipo x ambiente. Efectos relativamente consistentes de los QTL detectados fueron identificados para PG en los cromosomas 1, 2, 5, 6, 7, 9 y 10. Ningún QTL mostró efectos consistentes para DLL, TD y HMF (Fig. II.5). Únicamente en el cromosoma 5, QTL para DLL y TD fueron expresados en ambos ambientes, mientras que QTL para HMF siempre se expresaron sólo en uno de los dos ambientes.

La aproximación multi-carácter multi-ambiente para el análisis de QTL ayudó a entender las correlaciones genéticas entre caracteres. Los QTL ligados o pleiotrópicos con efectos consistentes en diferentes caracteres explican la existencia de correlaciones genéticas. Correlaciones genéticas positivas y consistentes fueron observadas para PG, TLL y MCA en los cromosomas 2, 6, 9 y 10 en ambos ambientes, y en el cromosoma 1 durante

la campaña 2009. En estos casos, la presencia del alelo del parental Mo17 aumentó la media del carácter. En el cromosoma 5 se observó una correlación genética entre PG, MCA, DLL y TD en ambos ambientes, donde la presencia del alelo del parental B73 incrementó la media del carácter (excepto para TD).

Del total de la variancia fenotípica, el modelo multi-QTL explicó entre un 6 y un 24% de la variación de los caracteres en cada ambiente (Fig. II.6). En promedio, el PG, la TLL y el MCA fueron los caracteres con la mayor proporción fenotípica explicada (24, 18 y 16%, respectivamente), seguido por la TD, la HMF y la DLL (15, 11 y 10%, respectivamente). La homogeneidad relativa de la variancia genética explicada por el modelo multi-QTL a través de ambientes para PG, TLL y MCA (Fig. II.6) concuerda con el hallazgo de QTL con efectos consistentes a través de ambientes. En el caso de la DLL, la HMF y la TD, la heterogeneidad de la variancia genética explicada por el modelo multi-QTL a través de ambientes concuerda con la existencia de interacción genotipo x ambiente (Fig. II.6) y los QTL de efectos inconsistentes a través de ambientes.

Genes candidatos asociados a los QTL

Los genes candidatos que regulan los QTL del modelo multi-QTL fueron determinados usando la base de datos del Maize GDB a través de la identificación de genes dentro de los intervalos delimitados por marcadores donde los QTL fueron detectados. Debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos a los cuales podrían estar relacionados los genes detectados, estos fueron agrupados en siete categorías inferidas de acuerdo a las funciones descriptas en la literatura. Las categorías seleccionadas fueron división celular, crecimiento y diferenciación celular, metabolismo basal, relacionado a hormonas, respuesta a estrés, relacionado a patógenos y desconocido. De estas categorías, los genes relacionados con división celular, crecimiento y diferenciación celular y relacionado a hormonas fueron los más relevantes para los caracteres de llenado de grano evaluados.

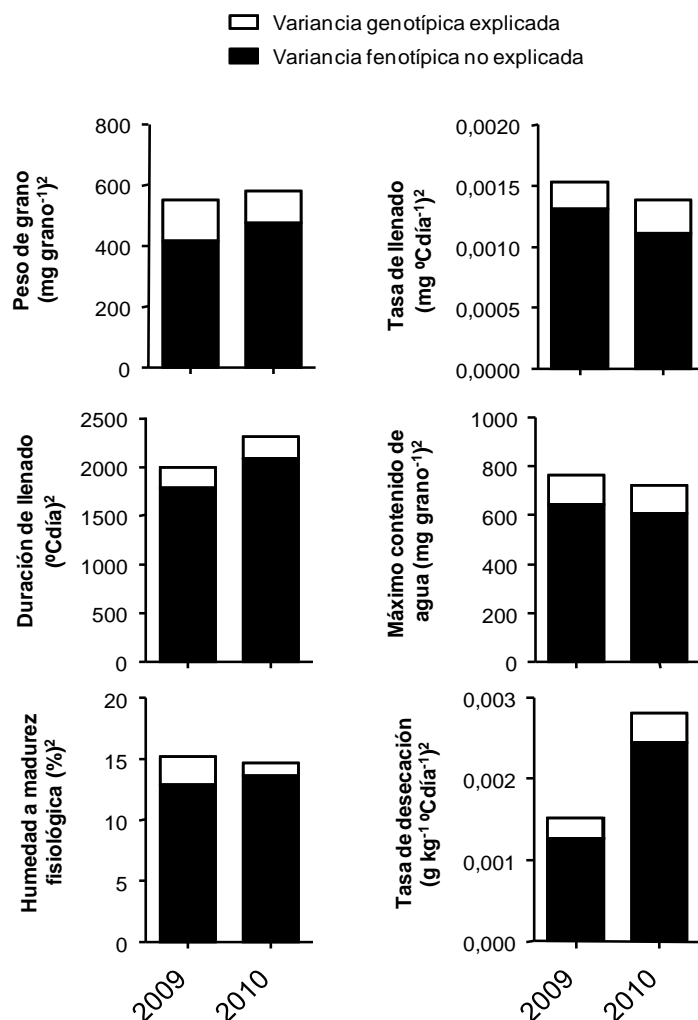


Figura II.6: Proporción del total de la variancia fenotípica explicada por el modelo multi-QTL para peso de grano, tasa de llenado, duración de llenado, máximo contenido de agua, tasa de desecación y humedad a madurez fisiológica en dos ambientes (2009 y 2010).

Un total de 2791 genes fueron identificados para los diez QTL. La lista completa de genes puede ser encontrada en la tabla anexa A1, junto con la función inferida para cada gen específico, y un resumen es presentado en la Tabla II.3. Brevemente, los intervalos evaluados mostraron desde 18 a 597 genes asociados con diferentes funciones (Tabla II.3). Cuando el número total de genes fue considerado, el 20 % estuvo relacionado con funciones de metabolismo basal, 9 % con funciones de crecimiento y diferenciación celular, 4 % con división celular, 2 % asociado a respuesta a estrés, 2 % con funciones relacionadas a hormonas, 2 % con funciones relacionadas a patógenos y 61 % con funciones desconocidas.

Tabla II.3: Número de genes identificados agrupados de acuerdo a su función inferida para los 10 QTL detectados en el modelo multi-QTL asociado con peso de grano, tasa de llenado, máximo contenido de agua, duración de llenado, tasa de desecación y humedad a madurez fisiológica. Los intervalos de marcadores se detallan para cada QTL. Los genes fueron identificados usando la base de datos del Maize Gene Data Base dentro de los intervalos donde los se detectaron los QTL. La lista completa puede encontrarse en la Tabla A1.

QTL	Intervalo	División celular	Número de genes identificados agrupados de acuerdo a su función inferida					Desconocido
			Crecimiento y diferenciación celular	Metabolismo basal	Relacionado a hormonas	Respuesta a estrés	Relacionado con patógenos	
1	umc161a-be639426	29	53	125	11	17	6	356
2	php20017a-umc1560	1	1	4	0	2	0	10
3	bx4-umc1757	7	29	34	4	3	6	163
4	rz87(clp)-bnlg1892c	22	33	104	8	12	6	389
5	umc1656-sdg102c	7	11	37	6	2	5	115
6	csu926(sec61)-umc2316	20	14	45	1	4	3	141
7	umc2327-umc1927	6	40	37	4	2	2	121
8	bnlg244-umc1698	9	18	59	4	0	5	133
9	umc95-umc1078	14	33	84	9	12	5	211
10	agrr37c-umc1196	6	17	26	3	0	2	83

Discusión

La metodología de muestreo utilizada para caracterizar la población de RILs siguió protocolos previamente utilizados para caracterizar (y diferenciar) híbridos comerciales y líneas puras (Borrás et al., 2003, 2009; Gambín et al., 2007). A pesar de consumir mucho tiempo y trabajo, la información fenotípica generada mostró la importancia de realizar este tipo de mediciones para estudiar el desarrollo del grano, ya que se pueden alcanzar PG similares a través de diferentes combinaciones de TLL y DLL. De acuerdo al conocimiento actual en fisiología de cultivos, estos dos caracteres están controlados por mecanismos fisiológicos distintos (Borrás y Gambín, 2010), lo que sugiere un control genético diferencial. Los resultados obtenidos apoyan la idea de un control genético diferencial, ya que los QTL consistentes para TLL no co-localizaron con QTL consistentes para DLL.

La co-localización de QTL consistentes para los caracteres TLL y PG con QTL relacionados al MCA ayuda a explicar las correlaciones fenotípicas comúnmente reportadas en maíz y otras especies (Borrás y Westgate, 2006; Swank et al., 1987; Calderini et al., 2000). La correlación entre los caracteres MCA, TLL y PG es bien conocida actualmente (Borrás et al., 2003), donde el MCA está relacionado al establecimiento temprano de la capacidad del grano como destino de asimilados y la TLL está determinada por eventos que se dan temprano durante el llenado de granos (Reddy y Daynard, 1983). La co-localización de QTL para estos caracteres agrega información genética relevante para la disección genética del PG.

Los valores de heredabilidad para PG fueron similares a los reportados previamente en la literatura (revisión de Sadras, 2007), y las heredabilidades correspondientes a los caracteres del llenado de granos fueron similares a los recientemente reportados en sorgo (Gambín y Borrás, 2011). El PG y el MCA mostraron los valores más altos, seguidos por la TLL. La DLL, la TD y la HMF presentaron menores valores de heredabilidad. Es interesante que ninguno de los componentes del PG (TLL y DLL) mostrara heredabilidades mayores que PG, sugiriendo que la disección de caracteres complejos en otros fisiológicamente más simples no implica que estos serán más sencillos para el estudio de sus bases genéticas. Sin embargo, estudiar caracteres fisiológicamente más simples implica estudiar caracteres cuya determinación esté asociada a un menor número de genes. Por lo tanto, estudiar tasa o duración de llenado me permitirá reducir la cantidad de genes que están involucrados en la determinación del carácter debido a que al ser caracteres independientes lo más probable es que estén regulados por genes diferentes. Por otro lado, la menor heredabilidad observada al disectar el carácter PG podría estar asociada a una compensación entre los

procesos fisiológicos que lo determinan. Esto es claro en sorgo donde se observó una relación negativa entre tasa y duración de llenado cuando se evaluaron una serie de líneas endocriadas para caracteres de llenado (Gambín y Borrás, 2011). Sin embargo, en el caso de maíz esto no es tan claro ya que tasa y duración son caracteres independientes debido a que las regiones genómicas asociadas a la determinación de la tasa de llenado son distintas de aquellas que determinan la duración del llenado de grano. Estos resultados abren un interrogante a lo propuesto por Tardieu y Tuberosa (2010) que sostienen que al disectar un carácter complejo obtengo caracteres más simples y heredables. Estas diferencias pueden estar asociadas al modo en el que se disectó del carácter. En el caso de esta tesis, el PG se disectó en sus componentes tasa y duración para cada ambiente evaluado. Por otro lado, Reymond et al. (2003) disectaron la tasa de elongación foliar en sus distintas respuestas a condiciones ambientales.

La existencia de QTL afectando el PG en maíz han sido reportados por varios autores quienes detectaron una gran cantidad de regiones de ADN distribuidas a lo largo del genoma (Schön et al., 1994; Austin y Lee, 1996, 1998; Frova et al., 1999; Li et al., 2007, 2012). Sin embargo, la gran mayoría de estos QTL fueron notoriamente susceptibles a los efectos ambientales, siendo estables sólo unos pocos. La alta variabilidad de estos resultados puede deberse a la falta de un análisis estadístico adecuado. La mayoría de los estudios que involucran diferentes caracteres y/o ambientes no consideran las correlaciones entre caracteres y la variabilidad entre ambientes. Aproximaciones estadísticas para múltiples caracteres y múltiples ambientes representan una herramienta de gran valor que permite considerar las correlaciones genéticas entre caracteres y ambientes (Malosetti et al., 2008; Singh et al., 2012; Jiang y Zeng, 1995) y reducir el error tipo uno cuando se testean los efectos de los QTL (Piepho, 2005). El análisis multi-carácter multi-ambiente representa una aproximación más realista que los análisis de QTL individuales, ya que los procesos fisiológicos están habitualmente correlacionados.

Todos los QTL contenidos en el modelo multi-QTL mostraron coincidencias relevantes con QTL previamente reportados. Lo más interesante fue la consistencia de los QTL para TLL y MCA con QTL para un carácter emergente (PG) en el cromosoma 6, el cual coincidió con numerosos QTL reportados para PG en una posición similar (entre los bins 6,02 y 6,05; Ribaut et al., 1997; Austin y Lee, 1996, 1998; Melchinger et al., 1998; Peng et al., 2011). Es razonable pensar que esta región es muy importante para la determinación del PG, ya que fue detectada en diferentes contextos genéticos y condiciones ambientales.

Además, los QTL para PG (Schön et al., 1994; Austin y Lee 1996, 1998; Melchinger et al., 1998) y los de TLL (Liu et al., 2011) detectados en el cromosoma 2 (bins 2,06-2,08)

co-localizaron con QTL consistentes para PG, TLL y MCA de este estudio. Guo et al. (2011a) y Capelle et al. (2010) reportaron un QTL para PG localizado en la misma región que el QTL detectado en el cromosoma 5 de este estudio (bin 5,04). Los QTL consistentes para PG, TLL y MCA detectados en el cromosoma 7 (bin 7,02) co-localizaron con QTL reportados para TLL (Liu et al., 2010). Austin y Lee (1998) y Capelle et al. (2010) detectaron QTL en el cromosoma 9 (bins 9,02-9,05) al igual que en este trabajo. Finalmente, para el QTL consistente localizado en el cromosoma 10, Peng et al. (2011) detectó algunos QTL para PG, volumen de grano y largo de grano en la misma región.

A partir de la revisión de trabajos en los cuales se realizó mapeo de QTL y se detectaron regiones que co-localizaron con los QTL detectados en este capítulo, se observaron principalmente dos enfoques. Uno de los enfoques utilizado fue el de componentes numéricos tanto para caracteres asociados al peso de grano (Guo et al., 2011; Liu et al., 2011; Peng et al., 2011), como para caracteres asociados a la espiga (Austin and Lee, 1996, 1998; Guo et al. 2011). Por otro lado, algunos trabajos evaluaron caracteres aislados que no siempre estaban correlacionados y que no se enmarcaron dentro de un modelo determinado (Schön et al., 1994; Ribaut et al. 1997; Melchinger et al. 1998). Esto sugiere que existen regiones genómicas asociadas a la determinación del peso del grano que son estables a través de distintos fondos genéticos y/o ambientes evidenciando la importancia de buscar genes candidatos que estén detrás de la determinación del carácter. A su vez, el modelo propuesto en este capítulo no sirvió para diferenciarse de las aproximaciones utilizadas en otros trabajos debido a que independientemente de la aproximación utilizada se detectaron QTL localizados en regiones similares. Sin embargo, el enfoque aplicado en este capítulo permitió discriminar que procesos fisiológicos estaban afectando al peso de grano en las distintas regiones del genoma. Esto permite acotar la búsqueda de genes a aquellos que estén vinculados con el proceso fisiológico en cuestión.

Los intervalos de marcadores para los QTL consistentes asociados con PG, TLL y MCA en los cromosomas 1, 2, 5, 6, 7, 9 y 10 mostraron genes asociados a división y diferenciación celular. Los genes más interesantes asociados a los caracteres de llenado de granos fueron enzimas sacarosa y almidón sintasa (Prioul et al., 1994), transportadores de azúcares y proteínas (Patrick y Offler, 2001; Weber et al., 2005; Rosche et al., 2005), expansinas (Crossgrove, 2005), proteínas VQ motif (García et al., 2003; Wang et al., 2010), factores de transcripción NAC (Uuay et al., 2006), asociados a PYL8 (Guo et al., 2001b; Santiago et al., 2009) y genes asociados a la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma (Moon et al., 2004; Song et al., 2007).

Las enzimas sacarosa y almidón sintasa fueron detectadas en los cromosomas 5 y 10, respectivamente, y están implicadas en el desarrollo de asimilados necesarios durante el llenado efectivo de los granos (Prioul et al., 1994). Los productos enzimáticos (i.e. sacarosa, almidón, proteínas) son requeridos para el desarrollo del embrión y la deposición de compuestos de almacenamiento, llegando al grano en desarrollo a través de diferentes transportadores de azúcares y proteínas. Los genes que codificaron para los transportadores de azúcares MFS fueron observados en los cromosomas 1, 4, 7 y 9. Otro transportador de azúcar observado en el cromosoma 7 fue el “transportador de azúcar 8”. Los transportadores de proteína identificados fueron el “SEC 20 y 31” en el cromosoma 5, el “SEC61” en los cromosomas 1 y 9, y el “SEC 62” en el cromosoma 6. Los transportadores de azúcar y proteína juegan un papel clave en el control de los caracteres del llenado de grano (Patrick y Offler, 2001; Weber et al., 2005; Rosche et al., 2005).

Las expansinas son proteínas no enzimáticas involucradas en el alargamiento de la pared celular y la acumulación de agua (Samperdro y Crossgrove, 2005). Las expansinas identificadas fueron la “A-11” y la “A-23” en el cromosoma 4, y la “expansina-beta 8” en el cromosoma 7. Debido a la conocida coordinación entre la acumulación de agua y biomasa en los granos en desarrollo (Borrás y Gambín, 2010), la posible participación de los genes asociados a caracteres hídricos sobre el desarrollo del grano deben ser estudiados en profundidad.

Otros genes asociados con funciones de crecimiento y diferenciación celular en el intervalo evaluado fueron las proteínas VQ motif. La VQ motif es una proteína esencial para el funcionamiento del gen *IKU 1* (Wang et al., 2010). *IKU 1* es un gen que se expresa durante el crecimiento temprano del endosperma afectando el tamaño final del grano (García et al., 2003). Wang et al. (2010) reportó una reducción en el crecimiento del endosperma y la producción de granos en *Arabidopsis thaliana* cuando utilizó el mutante *iku 1*, mientras que la restauración de la función del gen en el edosperma fue suficiente para rescatar el tamaño de la semilla.

Los factores de transcripción NAC pertenecen a una de las familias de factores de transcripción más grandes del reino vegetal. Las proteínas NAC fueron encontradas en los cromosomas 7 y 9, y están involucradas en la re movilización de nutrientes desde las hojas a los granos en desarrollo (Uuay et al., 2006). Uuay et al. (2006) reportaron la presencia de genes NAC asociados a senescencia acelerada e incremento en el contenido de proteína en trigo. Los autores mostraron que las variedades modernas de trigo cuentan con el alelo no funcional del gen NAC, retardando la senescencia y reduciendo el contenido de proteína en el grano de trigo. Estos factores de transcripción NAC afectaron el PG y la DLL.

Los QTL consistentes para PG, DLL y TD en el cromosoma 5 mostraron la presencia de algunos genes relacionados con hormonas. Dos genes resistentes a pyrabactinas 8 (PYL8) fueron destacados. Estos genes están involucrados en la vía de señalización del ABA como hormonas receptoras (Santiago et al., 2009). Los genes PYL8 pertenecen a la familia PYR/PYL (Guo et al., 2001b). Santiago et al. (2009) propusieron que la función de los PYR/PYL es anular el bloqueo de la señalización del ABA impuesto por la proteína A fosfatasa 2CS (A PP2Cs), un regulador negativo de ABA, conduciendo a la respuesta del ABA. Esta respuesta es regulada por genes que codifican para una proteína que contiene repeticiones de tetracopeptidos, la cual fue encontrada en el mismo intervalo y está involucrada en la regulación del desarrollo de la concentración de humedad (Capelle et al., 2010) y la muerte celular programada en el endosperma (Young y Gallie, 2000a, 2000b).

Además de los genes mencionados previamente para los QTL consistentes, fue de particular interés el hecho de que ocho de los diez intervalos contuvieran genes involucrados en la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma. Casi todos los intervalos contuvieron al menos un gen que codificó para las proteínas RING (de su sigla en inglés "*Really Interesting New Gene*") con actividad ubiquitina-E3 ligasa, mientras que otros intervalos contuvieron genes relacionados con el dominio F-box y el proteasoma 26-S, también involucrados en esta vía. La función general de esta vía es conjugar ubiquitinas con residuos de Lys dentro de sustratos proteicos que luego serán degradados en el proteasoma (Moon et al., 2004). Song et al. (2007) caracterizaron un QTL que controlaba el ancho y el peso del grano de arroz que codificaba una proteína del tipo RING con actividad ubiquitina-E3 ligasa. La pérdida de función del QTL incrementó la división celular y por ende el número de células resultando en espiguillas más anchas, una TLL más alta y un incremento en el PG. Por lo tanto, estos genes son de alta relevancia para el desarrollo del grano, y su presencia dentro de un QTL es importante.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han incrementado el conocimiento sobre las bases genéticas de la determinación del PG en maíz a través de la identificación de QTL asociados a procesos fisiológicos que determinan este carácter complejo. La población IBM Syn4 mostró variabilidad significativa para todos los caracteres estudiados, y algunos QTL fueron identificados para cada carácter fisiológico, ayudando a establecer un vínculo entre los procesos fisiológicos y las bases genéticas de la determinación del PG en maíz. Los QTL para TLL y MCA estuvieron frecuentemente asociados con QTL emergentes (PG), agregando información genética relevante para la correlación de estos caracteres.

Algunos de los QTL detectados fueron mencionados en la literatura, y una lista de genes asociados a los QTL más relevantes fue elaborada, y potenciales genes candidatos para estos QTL discutidos. Algunos de estos genes están asociados a un mecanismo fisiológico determinado, y son candidatos para futuras disecciones genéticas del PG en maíz. La pregunta que surge a partir de estos resultados es si las regiones genómicas asociadas al MCA, la TLL y el PG detectadas en líneas endocriadas se heredan en híbridos derivados. En otras palabras, si las líneas que presentan un alto PG producto de una alta TLL generan híbridos con alto PG producto de una alta TLL.

CAPÍTULO III

CORRELACIÓN ENTRE LÍNEAS PARENTALES E HÍBRIDOS DERIVADOS PARA CARACTERES DE LLENADO DE GRANOS EN MAÍZ.

Introducción

El rendimiento en grano es considerado un carácter altamente complejo. Una alternativa para simplificar esta complejidad es estudiar en forma individual los mecanismos fisiológicos relacionados con la determinación de los componentes principales del rendimiento, número de granos por unidad de superficie y el PG. Si bien el número de granos es el componente que explica la mayor proporción en la variación del rendimiento, ambos componentes afectan al rendimiento (Borrás y Gambín, 2010). El PG individual varía marcadamente entre genotipos de la misma especie creciendo en condiciones no limitantes. Es un carácter que está en gran parte determinado genéticamente (Reddy y Daynard, 1983), y cuya variabilidad es alcanzada a través de distintas combinaciones de TLL y DLL.

Se ha observado variabilidad genética para los caracteres de llenado de grano en líneas elite de programas de mejoramiento actuales y exóticas, y entre híbridos comerciales de distintas regiones productivas (Cross, 1975; Wang et al., 1999; Gambín et al., 2007; Borrás et al., 2009). Gambín et al. (2007) caracterizaron 12 híbridos comerciales argentinos y observaron que las diferencias en PG fueron consecuencia de diferentes combinaciones de TLL y DLL. Resultados similares fueron obtenidos por Borrás et al. (2009) cuando caracterizaron 60 líneas endocriadas adaptadas a la región central de EE.UU. Estos estudios estuvieron principalmente enfocados en la disección de las bases genéticas de los caracteres de llenado de grano. Lo que aún debe ser determinado es el valor de estudiar caracteres de llenado en líneas o en híbridos. Estudios recientes sobre las bases genéticas de los caracteres de llenado han sido conducidos sobre líneas recombinantes (Liu et al., 2011; Li et al., 2012; Capítulo II) sin considerar el valor que estos resultados pueden tener sobre el desempeño del híbrido.

A los fines del mejoramiento del cultivo la evaluación de caracteres en líneas tiene poco valor si el desempeño de la línea parental no se correlaciona con el desempeño de su híbrido derivado (Hallauer y Miranda, 1988). Cualquier información en líneas parentales que sea indicativo del desempeño de los híbridos es altamente deseable. Esto ayuda a eliminar la necesidad de realizar pruebas de cruzamientos y conducir experimentos extensos.

Existen muchos de estos estudios para caracteres como rendimiento, altura de planta y prolificidad, donde los resultados muestran bajas correlaciones entre líneas parentales e híbridos derivados (ver Hallauer y Miranda, 1988). Estos resultados pueden ser explicados por la alta plasticidad fenotípica de algunos de estos caracteres que es reflejada en su baja heredabilidad (Sadras y Slafer, 2012). Por otro lado, se sabe que el PG y sus componentes (TLL y DLL) muestran valores de heredabilidad intermedios a altos en líneas (Sadras, 2007; Gambín y Borrás, 2011; Capítulo II) siendo menores en los componentes fisiológicos que en el PG. Sin embargo, como el PG es el producto entre la TLL y la DLL es necesario realizar la disección de este carácter para entender como la herencia de estos procesos fisiológicos afecta al PG en un híbrido. De esta forma se podrá diferenciar entre las porciones aditiva y no aditiva de la variancia genética. Actualmente, las correlaciones entre el desempeño de líneas parentales e híbridos derivados para caracteres de llenado de grano en maíz son básicamente desconocidas.

La determinación del PG es generalmente descrita en términos de acumulación de materia seca y agua (Schnyder y Baum, 1992; Borrás et al., 2003; Rondanini et al., 2007; Bingham et al., 2007; Borrás y Gambín, 2010). El desarrollo del grano es generalmente dividido en tres fases: la fase *lag*, el período de llenado efectivo y la fase de maduración (Bewely y Black, 1985). La fase *lag* comienza en la polinización y es un período de activa división celular. Se caracteriza por incrementos en el contenido de agua con acumulación de biomasa casi nula. El período de llenado efectivo se caracteriza por una rápida acumulación de materia seca asociada a la deposición de reservas. Durante este período, alrededor de la mitad del llenado, los granos de maíz alcanzan el MCA (Borrás et al., 2003). Después de alcanzado el MCA, el agua es gradualmente reemplazada por la deposición de materia seca. La concentración de humedad dentro de los granos va disminuyendo a medida que transcurre el llenado de granos. La deposición de materia seca dentro de los granos se detiene a una concentración determinada de humedad. Este momento es conocido como madurez fisiológica, y es definido como el momento en el que el grano alcanza el peso máximo (Shaw y Loomis, 1950). La fase de maduración comienza en madurez fisiológica, mientras que los granos continúan perdiendo agua y entran en un período de quiescencia (Bewely y Black, 1985).

Existe poca información disponible que involucre el desempeño de los cruzamientos de prueba para PG y sus componentes fisiológicos determinantes. Cross (1975) y Wang et al. (1999) condujeron cruzamientos dialélicos para analizar la TLL y la DLL en maíz y reportaron efectos aditivos para ambos caracteres. Comparando cuatro líneas y sus híbridos derivados en combinaciones recíprocas, Poneleit y Egli (1979, 1983) también reportaron

efectos aditivos, además de efectos heteróticos comúnmente observados en híbridos. Técnicas de selección que utilizan la variación genética asociada a la componente aditiva podrían ser utilizadas para modificar la DLL y la TLL permitiendo aprovechar la información generada en el capítulo II sobre líneas a partir de la detección de QTL para estos caracteres fenotípicos. Sin embargo, información sobre la correlación entre el valor promedio de líneas parentales y sus híbridos derivados para caracteres de llenado de grano es necesaria.

Hipótesis

- El comportamiento de las líneas parentales se transmite a sus híbridos derivados para caracteres de llenado.

Objetivo específico

- El objetivo de este trabajo fue evaluar la correlación entre el desempeño de las líneas parentales y de sus híbridos derivados para caracteres de llenado de grano en maíz.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se llevaron a cabo tres experimentos que presentaron distintos sets de genotipos provenientes de germoplasma actual utilizado para el mejoramiento genético del maíz. En el experimento 1 (Exp. 1) diez líneas endocriadas propiedad de SyngentaSeeds Inc., codificadas como L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9 y T1, y nueve híbridos simples fueron evaluadas. Los cruzamientos fueron realizados cruzando la línea polinizadora o macho (T1) con las nueve líneas restantes (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9) como hembras.

En el experimento 2 (Exp. 2) se evaluaron nueve líneas registradas por empresas y con sus patentes vencidas, comúnmente denominadas ex-PVP en Estados Unidos (USDA-ARS NationalGeneticResourcesProgram), dos líneas endocriadas propiedad de Nidera S.A. y 18 híbridos simples. Las nueve líneas ex-PVP PHM10, PHH93, LH150, PHK29, PHN29, PHP02, PHK42, ML606 y WIL901 fueron cruzadas con las dos líneas macho propiedad de Nidera S.A. (codificadas como T2 y T3) para desarrollar los 18 híbridos simples.

El experimento 3 (Exp. 3) consistió en evaluar cuatro líneas endocriadas y cuatro híbridos derivados. Las líneas parentales todas propiedad de Nidera S.A. Se evaluaron las dos líneas utilizadas como hembras (codificadas como L10 y L11), las otras dos como machos (T4 y T5), y los cuatro híbridos derivados (T4 x L10 es Ax889Mg; T4 x L11 es Ax882Mg; T5 x L10 es Ax675Mg; T5 x L11 es Ax820Mg). Excepto por Ax675Mg, el resto de los híbridos han sido productos comerciales disponibles en Argentina.

Experimentos a campo

El Exp. 1 fue conducido en el campo experimental de SyngentaSeeds Inc. en Slater, Iowa, durante el 2008. El diseño experimental utilizado fue en bloques completos al azar con tres repeticiones. La fecha de siembra fue el 6 de mayo de 2008. Se utilizó una densidad de plantas de 8 plantas m⁻². Inicialmente las parcelas fueron sembradas al doble de la densidad objetivo y alrededor de V2-V3 se ralearon a la densidad objetivo. Las parcelas fueron de tres y cuatro surcos para líneas e híbridos, respectivamente, de seis metros de largo y distanciados a 0,76 metros.

El Exp. 2 fue conducido durante la campaña 2011/2012 en el Campo Experimental Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, en Zavalla, Provincia de Santa Fe, Argentina. El diseño experimental utilizado fue en bloques completos

al azar con tres repeticiones. El experimento fue sembrado el 17 de octubre de 2011. Se utilizó una densidad de 7 plantas m^{-2} . Inicialmente, las parcelas fueron sembradas al doble de la densidad objetivo y alrededor de V2-V3 se ralearon a la densidad deseada. Las parcelas fueron de tres surcos de seis metros de largo y distanciados a 0,52 metros.

El Exp. 3 fue conducido en el campo experimental de Nidera S.A., en Venado Tuerto, Provincia de Santa Fe, Argentina, durante la campaña 2003/2004. El diseño experimental utilizado fue en bloques completos al azar con tres repeticiones. La siembra se realizó el 30 de octubre de 2003 con una densidad de 9 plantas m^{-2} . Inicialmente, las parcelas fueron sembradas al doble de la densidad objetivo y alrededor de V2-V3 se ralearon a la densidad deseada. Las parcelas fueron de cinco surcos de seis metros de largo y distanciados a 0,52 metros.

Los experimentos fueron conducidos bajo riego y fertilización. En el Exp. 2 se aplicaron 150 mm de agua con un sistema de riego por aspersión durante floración y principios del llenado de granos. En el Exp. 3 un total de 200 mm de agua fueron aplicados con un sistema de riego por aspersión a lo largo de la estación de crecimiento. El objetivo de estas prácticas fue reducir eventos de estrés para que el cultivo se desarrolle normalmente. En todos los experimentos se controlaron plagas, enfermedades y malezas a través de aplicaciones de insecticidas, fungicidas y herbicidas recomendados para maíz. A su vez, las malezas también fueron removidas manualmente cuando fue necesario.

Mediciones fenotípicas

En cada experimento, la materia seca y el contenido de agua en grano fueron medidos a lo largo del desarrollo del mismo comenzando 15 días después de que el 50% de las plantas de la parcela alcancen el estado de antesis y finalizando en madurez de cosecha (15% de humedad en grano), siguiendo el procedimiento descrito en Borrás et al. (2003). Brevemente, una planta por parcela fue muestreada cada cuatro o cinco días entre las 07:00 y las 10:00 am. La espiga junto con sus chalas fue inmediatamente guardada en una bolsa plástica herméticamente cerrada y luego transportada al laboratorio. Se muestrearon 10 granos entre las posiciones 10 a 15 contando desde la base de la espiga dentro de una caja húmeda. Una vez muestreados los 10 granos, se midió el peso fresco de la muestra y luego de secar las muestras en estufa a 70°C durante 96 horas se midió el peso seco. De la diferencia entre el peso fresco y el peso se obtuvo el contenido de agua de los granos.

La TLL y la DLL fueron determinadas para combinación de genotipo x repetición ajustando un modelo bi-lineal siguiendo la metodología de Borrás et al. (2009):

$$PG = a + b TT \quad \text{para } TT \leq c \quad (1)$$

$$PG = a + b c \quad \text{para } TT > c \quad (2)$$

donde TT es el tiempo térmico después de polinización (°C día), *a* es la intercepta (°C día), *b* es la TLL durante el llenado efectivo de los granos (mg °C día⁻¹), y *c* es la DLL (°C día) (Fig. II. 1A). Las unidades térmicas fueron calculadas usando 0 °C como temperatura base (Muchow, 1990; Borrás et al., 2009). La temperatura media diaria fue registrada en una estación climática ubicada aproximadamente a 150 m del experimento.

El MCA fue determinado para cada combinación de genotipo x repetición ajustando un modelo curvilíneo como en Borrás et al. (2009):

$$CA = d + e TT + f TT^{1.5} + g TT^2 \quad (3)$$

donde CA es el contenido de agua en el grano y *d*, *e*, *f* y *g* son los parámetros del modelo.

La HMF fue determinada usando un modelo bilíneo relacionando el PG con el contenido de humedad del grano siguiendo a Borrás et al. (2009):

$$PG = h - i MC \quad \text{para } CH \geq j \quad (4)$$

$$PG = h - i MC \quad \text{para } CH < j \quad (5)$$

donde CH es la concentración de humedad del grano (%), *h* es la intercepta (mg grano⁻¹), *i* es la tasa de caída en la CH del grano durante el llenado (mg grano⁻¹ [%]⁻¹), y *j* es la HMF (%). Este modelo fue ajustado para cada combinación de genotipo x repetición.

La TD fue determinada usando un modelo de regresión lineal ajustado para cada combinación de genotipo x repetición relacionando la concentración de humedad y el tiempo térmico desde polinización hasta madurez fisiológica:

$$CH = k + l TT \quad (6)$$

donde CH es la concentración de humedad en el grano (g kg⁻¹), *k* es la intercepta (g kg⁻¹), y *l* es la TD (g kg⁻¹°C día⁻¹) (Fig. II.1B).

Todas las curvas explicadas anteriormente fueron ajustadas usando la técnica de optimización por iteraciones para cada combinación de genotipo x repetición a través del GraphPad Prism Demo v5.0 (Radushev, 2007).

A pesar de que la influencia materna en el crecimiento del grano ha mostrado ser más importante que los efectos no maternos o xenia (Poneleit y Egli, 1983; Jones et al., 1996) los muestreos se realizaron en el surco central para minimizar el cruzamiento entre líneas a través del polen.

Análisis estadístico

Cada experimento fue analizado en forma individual. Se utilizó un análisis de variancia (ANOVA) para cada carácter usando el PROC GLM de SAS® (SAS Institute, 1999). En cada experimento, las líneas parentales y los híbridos derivados fueron evaluados en forma conjunta a través del siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k(\beta_j) + \varepsilon_{ij} \quad (7)$$

donde Y_{ijk} es el valor observado del carácter del genotipo k th del tipo j th en el bloque i th, μ la media general, α_i el efecto bloque, β_j el efecto tipo (líneas parentales o híbridos derivados), $\gamma_k(\beta_j)$ el efecto del genotipo k th anidado dentro del tipo j th y ε_{ij} es el efecto residual. Para todos los genotipos, se calcularon medias corregidas.

Para los híbridos derivados de los Exps. 2 y 3, el efecto híbrido fue particionado en diferentes fuentes de variación. El modelo lineal para el análisis estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk} \quad (8)$$

donde Y_{ijk} es el valor observado del carácter de la línea hembra j th con la línea macho k th en el bloque i th, μ es la media general, α_i el efecto bloque, β_j el efecto de la línea hembra o aptitud combinatoria general de la hembra (ACG), γ_k el efecto de la línea macho o aptitud combinatoria general del macho (ACG), $\beta\gamma_{jk}$ la interacción entre la hembra y el macho o la aptitud combinatoria específica del cruzamiento jk th (ACE), y ε_{ijk} es el efecto residual.

La heterosis parental media (HPM) fue calculada como la superioridad del híbrido derivado con respecto al promedio de sus parentales (Munaro et al., 2011):

$$HPM = ([MHD - PP] / PP) \times 100 \quad (9)$$

donde MHD es la media del híbrido derivado, y PP es el valor promedio de los parentales. La significancia de los valores de heterosis para cada carácter en cada experimento

individual y en todos los experimentos en forma conjunta fue evaluada a través de una prueba t :

$$t = (X_{MHD} - X_{PP}) / [EE (X_{MHD} - X_{MP})] \quad (10)$$

donde X_{MDH} es el promedio de todos los híbridos, X_{MP} es el promedio de las líneas parentales, y EE es el error estándar de la diferencia entre promedios.

Los análisis de correlación fueron realizados comparando el promedio de las dos líneas parentales con su híbrido derivado para cada carácter. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson "r" para establecer el grado de asociación entre el desempeño de los parentales y el desempeño de su híbrido derivado para cada carácter.

En cada experimento, la heredabilidad en sentido amplio para cada carácter se calculó en base media siguiendo a Holland et al. (1998, 2003). Debido al tamaño muestral pequeño (sólo 8 genotipos) el cálculo de heredabilidad no se realizó en el Exp. 3. En los Exps. 1 y 2 se estimaron los componentes de la variancia a través del método de máxima verosimilitud restringida utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS[®] (SAS Institute, 1999), donde los efectos correspondientes al bloque y al genotipo fueron considerados como aleatorios con distribución normal independiente, media cero y una matriz de variancia-covariancia no estructurada. El efecto tipo (promedio de los parentales o híbridos derivados) fue considerado como fijo de acuerdo con Möhring et al. (2011). Los errores estándar aproximados de la heredabilidad fueron obtenidos por medio del método delta (Lynch and Walsh, 1997).

Resultados

Variabilidad fenotípica

Experimento 1

La variación dentro de cada tipo (líneas parentales o híbridos derivados) fue significativa para todos los caracteres evaluados ($p < 0,05$; Tabla III.1). El PG fue significativamente ($p < 0,01$) menor en las líneas parentales que en los híbridos derivados, que fueron desde 192 a 294 mg grano⁻¹ entre las líneas parentales, y desde 258 a 317 mg grano⁻¹ entre los híbridos derivados. La línea parental utilizada como macho (T1) mostró un PG levemente por encima de la media (263 mg grano⁻¹; Tabla III.1) cuando se lo comparó con el resto de las líneas.

Los dos componentes del PG, TLL y DLL, mostraron diferencias significativas dentro de cada tipo (Tabla III.1). La TLL de los híbridos fue similar a la TLL de las líneas parentales ($p > 0,05$), mostrando valores desde 0,295 a 0,444 mg °C día⁻¹ para todos los genotipos. La línea macho (T1) mostró una TLL cercana a la TLL promedio (0,333 mg °C día⁻¹) cuando se la comparó con el resto de las líneas hembras. Para el carácter DLL se observaron amplias diferencias entre líneas parentales y también entre híbridos derivados (Tabla III.1), donde los híbridos mostraron una DLL significativamente más larga que las líneas parentales ($p < 0,05$). Las largas DLL observadas en los híbridos estuvieron probablemente asociadas con la mayor DLL que mostró la línea macho con respecto a las líneas hembra (Tabla III.1).

Cuando se analizaron los caracteres hídricos del llenado de grano, las líneas parentales mostraron un menor MCA ($p < 0,01$), una mayor TD ($p < 0,01$) y un valor de HMF similar ($p > 0,05$) al de los híbridos. El MCA fue desde 148 a 230 mg grano⁻¹ y de 197 a 255 mg grano⁻¹ para líneas parentales e híbridos derivados, respectivamente. La línea macho mostró un MCA levemente mayor que el MCA promedio de las líneas hembra. La TD mostró valores entre 0,535 a 0,677 g kg⁻¹°C día⁻¹ y de 0,492 a 0,625 g kg⁻¹°C día⁻¹ para líneas parentales e híbridos derivados, respectivamente. La menor TD observada en los híbridos derivados respecto de sus líneas parentales estuvo relacionada con la mayor DLL. Además, la línea macho (T1) mostró la TD más baja entre las líneas parentales en consonancia con la DLL más larga.

Tabla III.1: *Peso de grano, tasa de llenado, duración de llenado, máximo contenido de agua, tasa de desecación y humedad a madurez fisiológica de diez líneas parentales y sus nueve híbridos derivados (Exp. 1).*

Tipo	Genotipo	Peso de grano	Tasa de llenado	Duración de llenado	Máximo contenido de agua	Tasa de desecación	Humedad a madurez fisiológica
		mg grano ⁻¹	mg °C día ⁻¹	°C día	mg grano ⁻¹	g kg ⁻¹ °C día ⁻¹	%
Líneas	L1	244	0,368	936	180	0,640	36,9
	L2	294	0,444	915	230	0,677	39,6
	L3	205	0,316	874	170	0,592	36,0
	L4	234	0,359	909	178	0,675	36,3
	L5	219	0,333	878	193	0,673	41,5
	L6	192	0,295	879	148	0,671	38,9
	L7	246	0,328	960	200	0,669	37,0
	L8	252	0,334	1003	152	0,597	32,2
	L9	273	0,346	1023	228	0,555	38,4
	T1	263	0,333	1047	203	0,535	36,2
Híbridos	L1 x T1	258	0,358	974	228	0,567	42,4
	L2 x T1	317	0,404	1040	237	0,625	37,8
	L3 x T1	272	0,345	1030	202	0,623	37,7
	L4 x T1	270	0,370	977	232	0,579	36,1
	L5 x T1	278	0,373	990	230	0,515	34,7
	L6 x T1	260	0,314	1047	197	0,562	36,3
	L7 x T1	287	0,385	1000	211	0,557	34,0
	L8 x T1	275	0,330	1068	204	0,549	35,7
	L9 x T1	316	0,326	1167	255	0,492	33,2
	Promedio líneas	240	0,347	931	187	0,639	37,4
Promedio híbrido	281	0,356	1033	222	0,563	36,4	
	<i>Tipo</i>	*** (18) †	ns	*** (99)	*** (11)	*** (0,078)	ns
	<i>Genotipo (Tipo)</i>	*** (11)	*** (0,029)	** (58)	*** (6)	** (0,046)	*** (2)

ns= no significativo, p>0.05

*, Significativo para p<0.05.

**, Significativo para p <0.01.

***, Significativo para p<0.001.

† valores de LSD para p≤0.05.

La HMF no difirió entre líneas parentales e híbridos derivados, pero si existieron diferencias para este carácter cuando se compararon los genotipos dentro de cada tipo (Tabla III.1). El rango explorado de HMF fue de 32 a 42 % (Tabla III.1). La línea macho (T1) mostró un valor de HMF similar al valor promedio de las líneas hembra (36.2 %).

Experimento 2

Los resultados del Exp. 2 mostraron amplias diferencias entre genotipos dentro de cada tipo para todos los caracteres de llenado de grano evaluados, al igual que en el Exp. 1.

En el Exp. 2 el PG fue significativamente mayor en los híbridos que en las líneas parentales ($p < 0,01$), con rangos explorados de 229 a 314 mg grano⁻¹ (Tabla III.2).

Ambos componentes del PG, TLL y DLL, mostraron diferencias significativas entre líneas parentales e híbridos derivados ($p < 0,01$; Tabla III.2). La TLL de las líneas parentales fue similar a la de los híbridos, con valores entre 0,294 y 0,364 mg °C día⁻¹. Ambas líneas macho (T2 y T3) mostraron TLL intermedias con respecto a las líneas hembra. Por otro lado, los híbridos mostraron DLL más largas que las líneas parentales ($p < 0,01$), que fueron desde 1086 a 1322 °C día para los híbridos y de 928 a 1277 °C día para las líneas parentales (Tabla III.2). Las dos líneas macho mostraron DLL más largas que el promedio de líneas hembra (Tabla III.2).

Tabla III.2: Peso de grano, tasa de llenado, duración de llenado, máximo contenido de agua, tasa de desecación y humedad a madurez fisiológica de 11 líneas parentales y 18 híbridos derivados (Exp. 2).

Tipo	Genotipo	Peso de grano	Tasa de llenado	Duración de llenado	Máximo contenido de agua	Tasa de desecación	Humedad a madurez fisiológica	
		mg grano ⁻¹	mg °C día ⁻¹	°C día	mg grano ⁻¹	g kg ⁻¹ °C día ⁻¹	%	
Líneas	PHM10	235	0,356	945	191	0,752	37,5	
	PHH93	239	0,332	981	195	0,675	38,2	
	LH150	306	0,314	1277	195	0,571	32,2	
	PHK29	241	0,327	1060	199	0,579	35,9	
	PHN29	251	0,340	1045	200	0,671	37,7	
	PHP02	231	0,364	928	197	0,762	40,0	
	PHK42	229	0,328	962	188	0,758	37,3	
	ML606	238	0,270	1170	157	0,588	28,6	
	WIL901	244	0,363	998	213	0,655	43,0	
	T2	251	0,249	1224	174	0,541	31,7	
	T3	262	0,301	1146	141	0,511	29,1	
Híbridos	PHM10 x T2	286	0,347	1107	209	0,608	32,8	
	PHM10 x T3	285	0,310	1194	179	0,583	26,2	
	PHH93 x T2	301	0,330	1197	214	0,595	32,5	
	PHH93 x T3	279	0,344	1086	179	0,637	30,8	
	LH150 x T2	301	0,322	1235	224	0,511	32,7	
	LH150 x T3	286	0,275	1322	159	0,445	27,2	
	PHK29 x T2	276	0,310	1197	198	0,577	30,7	
	PHK29 x T3	281	0,318	1178	173	0,526	30,8	
	PHN29 x T2	300	0,348	1169	221	0,611	34,6	
	PHN29 x T3	297	0,348	1152	183	0,583	28,9	
	PHP02 x T2	293	0,356	1136	221	0,608	36,1	
	PHP02 x T3	314	0,335	1200	205	0,572	29,2	
	PHK42 x T2	301	0,348	1156	220	0,575	33,8	
	PHK42 x T3	292	0,355	1088	195	0,582	32,3	
	ML606 x T2	292	0,304	1244	186	0,527	28,9	
	ML606 x T3	262	0,290	1171	157	0,467	19,7	
	WIL901 x T2	298	0,296	1304	189	0,523	29,3	
	WIL901 x T3	308	0,340	1199	189	0,551	32,2	
	Promedio líneas		246	0,333	1041	193	0,668	36,7
	Promedio híbridos		292	0,326	1185	195	0,560	30,5
	<i>Tipo</i>	***(24) [†]	ns	***(116)	** (15)	***(0,070)	*** (6)	
	<i>Genotipo (Tipo)</i>	***(14)	***(0,024)	***(67)	***(9)	***(0,039)	***(3)	
	<i>Líneas hembra</i> ^{††}	***(22)	***(0,037)	** (88)	***(14)	***(0,056)	** (4)	
	<i>Líneas macho</i>	ns	ns	ns	***(27)	*(0,108)	***(10)	
	<i>Hembra x Macho</i>	*(5)	ns	ns	***(14)	ns	ns	

ns= no significativa, p>0,05

*, Significativo para p<0,05.

**, Significativo para p <0,01.

***, Significativo para p<0,001.

[†] valores de LSD para p≤0,05.

^{††} Los efectos de la línea hembra, la línea macho y la interacción hembra x macho representan aptitud combinatoria general (ACG) para las líneas hembras, ACG para las líneas macho y aptitud combinatoria específica (ACE), respectivamente. Ver materiales y métodos para más detalles.

Cuando se analizaron los caracteres hídricos del llenado de grano, las líneas parentales mostraron un menor MCA ($p < 0,01$), una mayor TD ($p < 0,01$) y mayor HMF ($p < 0,01$) comparado con los híbridos. Se observaron diferencias significativas en el MCA alcanzado a mitad del llenado, con valores desde 141 a 213 mg grano^{-1} y de 157 a 224 mg grano^{-1} para las líneas parentales y los híbridos derivados, respectivamente. Las líneas macho mostraron MCA levemente menores que el MCA promedio de las líneas hembra (Tabla III.2). La TD fue desde 0,445 a 0,611 $\text{g kg}^{-1}\text{°C día}^{-1}$ en los híbridos derivados y desde 0,511 a 0,761 $\text{g kg}^{-1}\text{°C día}^{-1}$ en las líneas parentales. La menor TD observada en los híbridos estuvo asociada con la mayor DLL de los mismos. Las líneas macho (T2 y T3) mostraron TD levemente menores, en consonancia con su mayor DLL, que las líneas hembra (Tabla III.2).

La HMF fue mayor en las líneas parentales que en los híbridos derivados, en consonancia con su DLL más corta (Tabla III.2). Las líneas macho mostraron valores de HMF levemente menores que el promedio de las líneas hembra. Las líneas parentales exploraron un rango de variación desde 29 a 43 %, mientras que el de los híbridos derivados fue desde 26 a 36 % (Tabla III.2).

Debido a que en el Exp. 2 se utilizaron dos líneas macho, el desempeño de los híbridos se pudo particionar en distintas fuentes de variación (hembra, macho y hembra x macho). La contribución de las líneas parentales sobre el desempeño de su híbrido derivado fue detectada con la porción aditiva (ACG) de la variancia genética. La interacción hembra x macho fue detectada a través de la porción no aditiva (ACE) de la variancia genética. Se detectó un efecto hembra significativo en todos los caracteres evaluados ($p < 0,01$; Tabla III.2), donde algunas líneas contribuyeron al aumento del PG a través de distintas combinaciones de TLL y DLL. Se detectó un efecto macho en todos los caracteres hídricos del llenado de grano, como MCA, HMF y TD ($p < 0,05$; Tabla III.2), asociado a genes con efectos aditivos. La línea T3 contribuyó incrementando el valor de los caracteres en los híbridos evaluados, mientras que la línea T2 contribuyó con reducciones en los valores promedio de estos caracteres. Dentro de la porción no aditiva de la variancia genética (ACE) se detectaron diferencias significativas para PG ($p < 0,05$) y MCA ($p < 0,001$) entre las distintas combinaciones de macho x hembra. Estos resultados indican la presencia de genes con efectos tanto aditivos como no aditivos responsables de la variabilidad genética entre los distintos híbridos para PG y MCA. Para TLL, DLL, HMF y TD la variabilidad genética estuvo solamente relacionada con genes de efectos aditivos.

Experimento 3

En el Exp. 3 sólo se midieron caracteres fenotípicos asociados a la acumulación de materia seca. Los resultados mostraron diferencias significativas entre genotipos ($p < 0,01$), excepto para la DLL (Tabla III.3).

Tabla III.3: Peso de grano, tasa de llenado y duración de llenado, medidos en cuatro líneas parentales y sus cuatro híbridos derivados (Exp. 3).

Tipo	Genotipo	Peso de grano	Tasa de llenado	Duración de llenado
		mg grano ⁻¹	mg °C día ⁻¹	°C día
Líneas	L10	300	0,410	1101
	L11	308	0,373	1128
	T4	259	0,355	1046
	T5	261	0,331	1093
Híbrido	L10 x T4 (Ax889Mg)	352	0,412	1160
	L10 x T5 (Ax675Mg)	381	0,412	1235
	L11 x T4 (Ax882Mg)	308	0,358	1158
	L11 x T5 (Ax820Mg)	331	0,347	1247
	<i>Tipo</i>	***(70)	ns	** (228)
	<i>Genotipos (Tipo)</i>	** (21)	*** (0,019)	ns
	<i>Líneas hembra</i> ^{††}	*(78)	*** (0,040)	ns
	<i>Líneas macho</i>	ns	ns	ns
	<i>Hembra x macho</i>	ns	ns	ns

ns= no significativo, $p > 0,05$

*, Significativo para $p < 0,05$.

** , Significativo para $p < 0,01$.

***, Significativo para $p < 0,001$.

† valores de LSD para $p \leq 0,05$.

†† Los efectos de la línea hembra, la línea macho y la interacción hembra x macho representan aptitud combinatoria general (ACG) para las líneas hembras, ACG para las líneas macho y aptitud combinatoria específica (ACE), respectivamente. Ver materiales y métodos para más detalles.

Las líneas parentales mostraron PG significativamente menores que sus híbridos derivados (Tabla III.3). Esta diferencia en PG estuvo relacionada a una DLL más larga en los híbridos, sin observarse diferencias en la TLL (Tabla III.3).

Al igual que en el Exp. 2, el desempeño de los híbridos fue particionado en relación a la porción de la variancia genética asociada a las líneas parentales (ACG) y a la porción no aditiva de la variancia genética asociada a la interacción macho x hembra (ACE). Los caracteres no mostraron ACE significativa ($p > 0,05$), mientras que la ACG fue significativa para el PG ($p < 0,05$) y TLL ($p < 0,001$; Tabla III.3). Esto sugiere que los genes con efectos aditivos fueron responsables de la variabilidad genética de los caracteres.

Heterosis

El PG fue significativamente mayor en los híbridos derivados que en las líneas parentales independientemente del experimento (Tabla III.4), mostrando una HMP de 11,9, 16,4 y 21,8 % para los Exps. 1, 2 y 3, respectivamente. Cuando se disectó el PG en sus componentes fisiológicos, el Exp. 2 mostró que el mayor PG relativo de los híbridos con respecto a sus parentales estuvo asociado a heterosis para todos los caracteres evaluados (Tabla III.4). En el Exp. 1, los híbridos mostraron un PG mayor que las líneas parentales asociado a heterosis para MCA ($p < 0,01$), mientras que en el Exp. 3 la HMP para PG estuvo relacionada a heterosis para DLL ($p < 0,01$; Tabla III.4).

Cuando se analizaron los tres experimentos en conjunto todos los caracteres evaluados mostraron una HMP significativa ($p < 0,01$; Tabla III.4), donde los híbridos derivados mostraron mayores valores de PG, TLL, DLL y MCA, y menores valores de TD y HMF que sus líneas parentales (Tabla III.5). Los híbridos que mostraron los PG más altos derivaron de las líneas parentales con los PG más altos, y lo mismo ocurrió para la TLL, DLL, MCA, TD y HMF.

Las estimaciones de heredabilidad para cada carácter en cada experimento se presentan en la tabla III.5. Los caracteres con los mayores valores de heredabilidad a través de los experimentos fueron el MCA (0,94) y la HMF (0,78). El resto de los caracteres mostró valores más bajos y similares entre sí (PG: 0,73; TD: 0,73; TLL: 0,70; DLL: 0,63).

Tabla III.4: Heterosis parental media (HPM, %) en base a los valores promedio de los parentales para peso de grano (PG), tasa de llenado (TLL), duración de llenado (DLL), máximo contenido de agua (MCA), tasa de desecación (TD) y humedad a madurez fisiológica (HMF) en los tres experimentos.

Caracter	Promedio HPM	Rango	Exp. 1 HPM	Exp. 2 HPM	Exp. 3 HPM
			%		
PG	15,8***	0,7 to 36,1	11,9**	16,4***	21,8*
TLL	6,4*	-10,6 to 20,6	4,8 ns	7,7**	3,9 ns
DLL	6,4**	-1,8 to 17,4	4,4 ns	6,6**	9,8**
MCA	11,2***	-5,3 to 21,8	13,9**	11,0**	-
TD	-4,8**	-17,7 to 10,5	-4,0 ns	-6,2*	-
HMF	-6,3*	-31,8 to 16,0	-0,9 ns	-9,3**	-

ns=no significativo, $p>0,05$

*, Significativo para $p<0,05$.

** , Significativo para $p <0,01$.

***, Significativo para $p<0,001$.

Tabla III.5: Coeficientes de correlación de Pearson (r) para el desempeño promedio de las líneas parentales y el de los híbridos derivados, y valores de heredabilidad para peso de grano (PG), tasa de llenado de grano (TLL), duración de llenado de grano (DLL), máximo contenido de agua (MCA), tasa de desecación (TD), y humedad a madurez fisiológica (HMF). El desempeño promedio de las líneas parentales fue calculado como el promedio del desempeño de la línea hembra y la línea macho para el caracter de interés. Se listan los valores de heredabilidad para los Exps. 1 y 2 junto con sus respectivos errores estándar.

Caracter	Correlación de Pearson	n	Significancia	H ² promedio	Exp. 1 H ²	Exp. 2 H ²
PG	0,63	31	$p<0,001$	0,73	0,90±0,03	0,57±0,07
TLL	0,71	31	$p<0,001$	0,70	0,74±0,10	0,67±0,07
DLL	0,81	31	$p<0,001$	0,63	0,60±0,09	0,67±0,06
MCA	0,83	27	$p<0,001$	0,94	0,96±0,01	0,92±0,02
TD	0,61	27	$p<0,001$	0,73	0,79±0,07	0,68±0,06
HMF	0,71	27	$p<0,001$	0,78	0,72±0,08	0,84±0,03

H²: heredabilidad en sentido amplio

Discusión

En este estudio se llevaron a cabo tres experimentos en diferentes ambientes usando distinto germoplasma para analizar la correlación entre el desempeño de líneas parentales e híbridos derivados para los caracteres de llenado de grano. Considerando las limitaciones experimentales de este trabajo, tales como el reducido tamaño del set de genotipos evaluados (pocas líneas macho y/o pocos híbridos), y la falta de replicaciones de cada experimento en ambientes diferentes, es posible que exista un sesgo en las estimaciones de la ACG, la ACE y la heredabilidad. Sin embargo, los resultados fueron consistentes a través de los experimentos, y el análisis de correlación en el cual se analizan los caracteres de todos los experimentos en conjunto mostró resultados significativos.

En el capítulo II observamos que las regiones genómicas asociadas al peso del grano co-localizaban con aquellas que determinaban la tasa de llenado y el máximo contenido hídrico del grano. Sin embargo, estos resultados corresponden a líneas endocriadas y no a híbridos que son el producto final. Para responder esta pregunta comparamos el comportamiento de líneas parentales con sus híbridos derivados para los caracteres de llenado de grano. Los estudios de correlación entre el desempeño del promedio de los parentales y el de sus híbridos derivados representa información útil para el mejoramiento. Estos ayudan a determinar protocolos de fenotipado para los caracteres de interés y la necesidad de realizar cruzamientos para la conducción de extensos ensayos de híbridos simples en caso de que exista la necesidad de hacer evaluaciones en híbridos (Hallauery Miranda, 1988). Las correlaciones positivas observadas entre las líneas parentales y los híbridos para los caracteres de llenado agregan información relevante debido a que el desempeño de estos caracteres en líneas parentales es indicativo del desempeño que tendrá el híbrido derivado. Por lo tanto, la selección de líneas parentales que muestran un buen desempeño para los caracteres deseables del llenado de grano o la conducción de estudios de detección de loci de caracteres cuantitativos para estos caracteres utilizando líneas (Liu et al., 2011; Li et al., 2012; Capítulo II) son relevantes para el mejoramiento del maíz.

Desde el punto de vista genético, la correlación positiva entre líneas e híbridos para caracteres de llenado podría indicar que existe una gran proporción de acción génica aditiva afectando el desempeño de los híbridos (Rojas y Sprague, 1952). Los efectos aditivos representan la porción predecible del efecto genético y por lo tanto son de interés para los mejoradores. En este sentido, de los caracteres de llenado evaluados en este estudio, el PG y la TLL mostraron la acción génica aditiva más alta afectando el desempeño de los

híbridos. Delucchi et al. (2012) mostraron que la variabilidad genética del PG estuvo asociada a efectos genéticos aditivos, apoyando resultados de trabajos previos (Cross, 1975; Poneleit y Egli, 1983; Wang et al., 1999). Estos estudios resaltan la importancia de la contribución aditiva de los genes que determinan la DLL y la TLL en híbridos. Además, estas evidencias previas son apoyadas por las altas correlaciones entre las líneas parentales y los híbridos derivados observados en este trabajo.

Es aceptado que la acción génica aditiva tuvo un papel preponderante en el mejoramiento del desempeño de los híbridos actuales (Duvick et al., 2004). Sin embargo, la predicción de la relación entre el desempeño de las líneas parentales y el de sus híbridos derivados aún representa un desafío (Hallauer y Miranda, 1988). Por ejemplo, Gama y Hallauer (1977) evaluaron ocho caracteres de planta y espiga en 160 líneas parentales y 320 híbridos derivados. Los autores concluyeron que los caracteres medidos en líneas parentales no son indicativos del desempeño del híbrido derivado debido a los bajos coeficientes de correlación ($r = 0,09 - 0,39$). Estas bajas correlaciones podrían estar relacionadas con una alta modulación ambiental de los caracteres evaluados y por lo tanto una baja heredabilidad. En este trabajo se observó que el PG y la mayoría de los caracteres de llenado de grano presentaron altos valores de heredabilidad (Tabla 4), al igual que lo observado en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] (Gambín y Borrás, 2011). Al igual que en sorgo y en el Capítulo II para maíz la heredabilidad del PG fue mayor que para sus componentes fisiológicos demostrando que la disección de un carácter en otros genética y fisiológicamente más simples no siempre aumenta la heredabilidad. Esto sugiere que existen excepciones a lo propuesto por Tardieu y Tuberosa (2010) quienes sostienen que la disección de un carácter complejo tiene como resultado caracteres más simples y heredables. Sin embargo, las estimaciones de heredabilidad de este trabajo deben ser tomadas con precaución debido a las limitaciones experimentales mencionadas anteriormente. Las estimaciones de heredabilidad para caracteres asociados a la determinación del PG muestra valores más altos que para caracteres asociados a la determinación del número de granos y el crecimiento de planta (Sadras y Slafer, 2012). En floración, las plantas ajustan el número de granos a fijar de acuerdo al ambiente de crecimiento, minimizando la variabilidad en el tamaño del grano (Sadras, 2007; Gambín y Borrás, 2010). Como tal, no es de extrañar que los caracteres del llenado de grano muestren altas correlaciones entre líneas parentales e híbridos derivados.

La heterosis, que es la diferencia entre el desempeño de los híbridos y sus líneas parentales, es también un componente importante del efecto genético. Los resultados de este trabajo mostraron heterosis para PG, en consonancia con otros estudios (Poneleit y

Egli, 1979, 1983; Munaro et al., 2011). Cuando se analizaron los caracteres de llenado de grano, los mayores PG en híbridos con respecto a sus líneas parentales estuvieron principalmente relacionados con una mayor DLL, la cual a su vez estuvo asociada con una menor TD. La heterosis para DLL ha sido reportada previamente (Daynard et al., 1971; Poneleit y Egli, 1979), y los autores sugirieron que una combinación deseable de genes podría mantener los procesos fisiológicos que generen una DLL más larga. Los mecanismos que determinan el control de la DLL no se conocen con claridad, pero una mayor capacidad para mantener la actividad de la fuente con respecto a sus destinos de crecimiento, una menor TD y menor HMF, podrían explicar la mayor DLL de los híbridos respecto de las líneas. A su vez, considerando la independencia entre la DLL y la TLL observada en el capítulo II se podría pensar en cruzar líneas con que presenten QTL que aumenten la TLL con líneas que presenten alta DLL. De esta forma estaríamos combinando tanto la porción aditiva (QTL para TLL) como la porción no aditiva (heterosis para DLL) de la variancia genética para la generación de un híbrido.

Conclusiones

Tres grupos de genotipos representativos de germoplasmas comerciales actuales de distintos ambientes de crecimiento (Argentina y EE.UU.) testeados en diferentes sitios fueron utilizados para explorar la mayor diversidad genética y ambiental posible para caracteres relacionados al llenado de granos. Las correlaciones entre los desempeños de las líneas parentales y sus híbridos derivados para distintos caracteres de llenado de grano fueron significativos, mostrando valores intermedios a altos.

Actualmente, existen grupos de investigación trabajando en la disección de las bases genéticas de estos caracteres de llenado en líneas endocriadas. Los resultados del presente trabajo confirman que estos estudios genéticos están produciendo información valiosa para el desempeño de los híbridos derivados.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

El rendimiento final de los cultivos de grano es el producto de distintos procesos de crecimiento y desarrollo que ocurren a lo largo del ciclo. Estos procesos son modulados por distintos genes que a su vez interactúan entre sí y con el ambiente de crecimiento. Históricamente, el aumento de los rendimientos se ha logrado a través de selección usando mejoramiento convencional. En los últimos años los avances en genética molecular permitieron incorporar el uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento para identificar regiones asociadas a un carácter de interés (Eathington et al., 2007). En el caso de caracteres complejos, estas regiones genómicas generalmente explican una baja proporción de la variabilidad dificultando el estudio de su base genética. Debido a que el rendimiento es un carácter muy complejo, una aproximación al estudio de las bases genéticas que determinan este carácter es la disección del mismo en sus componentes determinantes para disminuir la cantidad de genes involucrados (Slafer, 2003).

Este tipo de aproximación fue utilizado en esta tesis a través del análisis de uno de los componentes del rendimiento, el peso individual de los granos. A pesar de que el peso de grano es considerado un carácter menos complejo que el rendimiento, debido a que su determinación está asociada a un menor número de granos, este sigue siendo un carácter complejo. Por lo tanto, para reducir su complejidad es posible disectar el peso de grano en caracteres con menores niveles de complejidad. En la presente tesis se estudió la base genética de este carácter a partir de los procesos fisiológicos que lo determinan, que son la tasa de llenado durante el llenado efectivo y la duración del período de llenado. A su vez, estos dos procesos fisiológicos se estudiaron en función de los caracteres hídricos del grano producto de la estrecha relación existente entre la dinámica de acumulación de biomasa y de agua en los granos de maíz (Borrás y Gambín, 2010). La importancia de estudiar la base genética de un modelo fisiológico es que permite diferenciar qué procesos fisiológicos específicos de la determinación del carácter emergente (peso de grano en el caso puntual de esta tesis) se asocian a los genes o QTL detectados, y a conocer la base genética de las correlaciones fenotípicas entre caracteres. Los resultados de esta tesis muestran que los genes que determinaron el peso de grano final estuvieron mayormente asociados a la tasa de llenado y al máximo contenido de agua, caracteres positivamente correlacionados entre sí y con el peso de grano. De esta forma, se pudo establecer un vínculo entre el fenotipo y el genotipo cuando se analizaron las dos escalas de detalle en forma conjunta. Además, se pudo confirmar que la tasa y la duración del llenado son procesos independientes, o sea que

su determinación está asociada a distintos genes, debido a que los QTL consistentes para estos caracteres no co-localizaron entre sí. Esta información se complementa con lo observado fenotípicamente en otros trabajos de la literatura (Gambín et al., 2007; Borrás et al., 2009). La independencia de estos caracteres demuestra que es posible mejorar genotipos a partir de cualquier combinación de tasa y duración de llenado sin que haya una correlación negativa que equilibre el peso de grano final.

Los resultados deben interpretarse con cuidado debido a que 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 y a la mayor cantidad de ciclos de recombinación que presenta respecto a una población de RILs convencional, la misma no es completamente representativa de la variabilidad genética existente en la especie ya que sólo está compuesta por dos alelos. A pesar de esta limitación los QTL detectados en este trabajo de tesis coinciden con muchos de los QTL para peso de grano reportados en la literatura (Schön et al., 1994; Austin y Lee, 1996, 1998; Ribaut et al., 1997; Frova et al., 1999; Li et al., 2007, 2012; Peng et al., 2011), generando un aporte relevante al identificar el mecanismo fisiológico que está detrás del QTL.

Con los QTL detectados se buscó profundizar el alcance de esta aproximación sugiriendo genes candidatos asociados a la determinación de los caracteres de llenado. Esto fue posible gracias a la posibilidad de contar con una amplia base de datos genéticos en la especie que permitió realizar una búsqueda de genes *in silico* dentro de los intervalos donde se detectaron los QTL. Los mismos fueron agrupados en categorías de acuerdo a su función. La selección de genes candidatos estuvo asociada a los procesos fisiológicos en los cuales estos se encontraban involucrados. Si bien esta aproximación puede ser discutible debido a la arbitrariedad en la selección y a la asignación de los genes en las distintas categorías establecidas, representa una alternativa interesante para futuros trabajos dentro de esta línea de trabajo.

Los resultados obtenidos en el Capítulo II de esta tesis son relevantes al nivel de líneas endocriadas. En el Capítulo III se testeó la aplicación de lo observado en líneas parentales sobre sus híbridos derivados para saber qué aplicación tenían los resultados observados anteriormente. En los programas de mejoramiento solo el desempeño de las líneas parentales es utilizado como criterio de selección para caracteres altamente heredables (Hallauer y Miranda, 1988; Mihaljevic et al., 2005). Para caracteres más complejos o menos heredables como rendimiento, número de granos, etc., se utiliza el desempeño de los cruzamientos de prueba o híbridos derivados como criterio de selección. Esto genera la necesidad de realizar numerosas pruebas que resultan costosas y consumen

mucho tiempo. Los resultados de mi tesis muestran altas correlaciones entre el desempeño de las líneas parentales y el de sus híbridos derivados tanto para el peso de grano como para todos los caracteres del llenado de grano. Esto significa que existe un alto grado de probabilidad que una línea parental con un patrón de llenado de grano determinado vaya a dar un híbrido derivado con ese mismo patrón. Estos caracteres fueron altamente heredables explicando estas altas correlaciones entre líneas e híbridos. Esta información resulta relevante en mejoramiento. Ayuda a reducir no sólo la cantidad de genotipos a evaluar sino también el tiempo necesario para realizar las evaluaciones pertinentes, permitiendo aumentar la cantidad de líneas a evaluar y aumentando así la eficiencia del programa.

Si bien los resultados de la tesis en relación a la correlación entre líneas parentales e híbridos derivados son consistentes y relevantes, la aproximación utilizada presenta algunas limitaciones que es bueno aclararlas. Los tres experimentos realizados en el Capítulo III no presentaron genotipos en común ni fueron replicados en ambientes distintos. A su vez, en los experimentos se utilizaron pocas líneas polinizadoras o macho pudiendo generar sesgos en las estimaciones de aptitud combinatoria general y específica, y en las estimaciones de heredabilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con los expuestos en otros trabajos (Cross, 1975; Wang et al., 1999; Delucchi et al., 2012), donde el peso de grano y la tasa de llenado presentan una gran proporción de acción genética aditiva, y donde la acción génica no aditiva observada en peso de grano estuvo generalmente asociada a la heterosis para duración del llenado (Daynard et al., 1971; Poneleit y Egli, 1979; Munaro et al., 2011). Los resultados de esta tesis muestran cómo se compone el peso de grano en términos genéticos de acuerdo a la acción génica de sus mecanismos fisiológicos. A su vez, de los resultados observados tanto en el capítulo II como en el capítulo III se desprende la posibilidad de combinar las porciones aditiva y no aditiva de la variancia genética en un mismo híbrido. En el capítulo II observamos que las regiones genómicas que generan variaciones en el peso de grano eran las mismas que para tasa de llenado y máximo contenido de agua, y en general distintas de aquellas asociadas a duración de llenado. Estas regiones genómicas presentaron efectos relacionados a la porción aditiva de la variancia genética. En el capítulo III, pudimos confirmar la importancia de la acción génica aditiva en los caracteres tasa de llenado y peso de grano. Estos resultados estuvieron en línea con los observados en la literatura para landraces de origen Argentino (Delucchi et al., 2012) y líneas norteamericanas (Cross, 1975; Wang et al., 1999). Por otro lado, el capítulo III muestra el aporte de la acción génica no aditiva sobre la determinación del peso final de grano a través de la heterosis observada en la duración del llenado. El alargamiento del

periodo de llenado de granos observado en híbridos derivados respecto de sus líneas parentales ya había sido reportado previamente en la literatura (Daynard et al., 1971; Poneleit y Egli, 1979). Por lo tanto, considerando la independencia de los procesos fisiológicos que determinan el peso de grano y su acción génica diferencial se podría pensar en aumentar el peso de grano a partir de una alta tasa de llenado (acción génica aditiva) con una alta duración del periodo de llenado (acción génica no aditiva) evitando compensaciones indeseables entre los caracteres.

Una falencia que surgió en este trabajo de tesis estuvo asociada a no haber realizado cruzamientos dialelicos con la población IBM Syn4 para evaluar la correlación línea-híbrido en el capítulo III. Uno de los motivos por los cuales no se re utilizó esta población fue la magnitud del experimento que implicaba un cruzamiento dialelico con una población de 245 individuos. Además, haber utilizado la población IBM Syn4 hubiera acotado las conclusiones finales a solo dos grupos heteróticos y/o dos alelos, los cuales no son representativos de la variabilidad de la especie. Es por eso que para poder ampliar la variabilidad explorada utilizamos distintos cruzamientos dialelicos provenientes de distintos programas de mejoramiento. Si bien el número de genotipos evaluados no era tan alto, creemos que los resultados fueron lo suficientemente robustos para concluir que las líneas con un determinado comportamiento durante el llenado de granos generan un híbrido con un comportamiento similar.

Finalmente es importante mencionar que de los Capítulos II y III se desprende la importancia de utilizar protocolos estandarizados cuando se trabaja con caracteres fisiológicos complejos de medir, con poblaciones de gran cantidad de genotipos y con experimentos conducidos en diferentes ambientes. En esta tesis seguimos el protocolo de medición de Borrás et al. (2003) en todos los experimentos. Si bien este tipo de mediciones consume mucho tiempo y trabajo, haber tenido un protocolo estandarizado nos permitió trabajar con bajos coeficientes de variación (ver Capítulo II) o bajo error experimental, lo cual permitió realizar estimaciones precisas de heredabilidad y por consiguiente de la posición de los QTL. El protocolo está basado en un conocimiento avanzado de fisiología de cultivos, de lo cual carecen varios trabajos anteriores en QTL y peso de grano en maíz (Liu et al., 2012; Li et al., 2011). El hecho de trabajar en función del tiempo térmico en vez de días calendario permitió comparar los distintos ambientes explorados por los genotipos independizándonos del efecto de la temperatura. El aumento de las investigaciones enfocadas en el estudio de bases genéticas utilizando poblaciones ya sea de RILs o de paneles de asociación implica trabajar sobre experimentos de grandes dimensiones manipulados por grupos de trabajo y no por personas individuales. Trabajar con protocolos estandarizados como los

mencionados es actualmente una necesidad para poder reducir errores experimentales, y por consiguiente falsos positivos, y poder arribar a conclusiones robustas.

En los capítulos II y III de la tesis obtuvimos resultados similares asociados a la heredabilidad de los caracteres evaluados. En este sentido, observamos que el carácter más complejo en términos de cantidad de genes que lo regula (PG) presentó una mayor heredabilidad que los procesos fisiológicos que lo determinan (TLL y DLL). Este resultado no coincide con lo propuesto por Tardieu y Tuberosa (2010) quienes sostienen que la disección de un carácter complejo en otros más simples genera aumentos en la heredabilidad. Por otro lado, Gambín y Borrás (2011) siguiendo esta aproximación arribaron a resultados similares a los observados en esta tesis abriendo un interrogante al concepto explicado anteriormente. Una posible explicación puede estar asociada a que al disectar un carácter en sus componentes fisiológicos el método de medición es más complejo pudiendo aumentar el error de medición y reduciendo así la estimación de la heredabilidad. Esto es válido cuando disectamos el peso de grano en sus componentes tasa y duración. Sin embargo, esta explicación pierde consistencia cuando evaluamos el máximo contenido de agua, carácter que presenta mayor heredabilidad que el peso de grano. Este carácter presenta una alta complejidad en su medición respecto al PG ya que involucra un protocolo bien detallado que busca evitar pérdidas de humedad en los granos desde que se cosechan las espigas en el campo hasta que se extraen los granos y son pesados en el laboratorio. A partir del razonamiento anterior y de lo observado en la literatura (Gambín y Borrás, 2011) para los mismos caracteres sobre los que se trabajó en esta tesis podemos pensar que la teoría propuesta por Tardieu y Tuberosa (2010) presenta excepciones a la regla. Otra explicación a esta excepción está radicada en el tipo de disección que se haga del carácter. En el caso de esta tesis, la disección del PG fue realizada en función de sus componentes fisiológicos tasa y duración en ambientes determinados. Por otro lado, Reymond et al. (2003) utilizaron un enfoque distinto para realizar la disección del carácter. Estudiaron la tasa de elongación foliar y la disectaron en función de su respuesta a la temperatura del meristema, al déficit de presión de vapor, y al estatus hídrico del suelo. De esta forma surge la pregunta si evaluar la tasa y duración de llenado en función de su respuesta al ambiente podría aumentar la heredabilidad del carácter.

Contraste de hipótesis planteadas:

Hipótesis 1: *Las regiones genómicas responsables de cambios en la tasa de llenado de grano son distintas de aquellas asociadas a la duración de llenado.*

La tasa y la duración del llenado de granos son procesos distintos que están involucrados en la determinación del mismo carácter (el peso de grano). La tasa de llenado es un proceso de crecimiento asociado a la determinación del peso potencial del grano alrededor de floración. La duración del llenado es un proceso de desarrollo cuya determinación está asociada a procesos de muerte celular programada del endosperma y desecación del grano. En esta tesis se pudo confirmar que la independencia de los caracteres tasa y duración del llenado a nivel fenotípico tiene un correlato a nivel genético ya que las regiones genómicas asociadas a la determinación de ambos caracteres no co-localizaron entre sí. Este resultado está expuesto en la figura II.5 donde se puede apreciar que los QTL consistentes para tasa y duración de llenado, o sea aquellos que se expresaron en los dos ambientes con efectos similares, estuvieron ubicados en regiones distintas. Esta evidencia nos permite aceptar la primera hipótesis planteada en esta tesis.

Hipótesis 2: *Cambios en la tasa de llenado están explicados por las mismas regiones genómicas que explican los cambios en el máximo contenido de agua.*

El peso potencial del grano está estrechamente relacionado con el número de células endospermáticas que se establecen temprano en el desarrollo del mismo. Un mayor número de células endospermáticas indica una mayor cantidad de sitios potenciales para la posterior acumulación de almidón. Cambios en el peso de grano potencial normalmente se ven reflejados en cambios en la tasa de llenado. Se ha demostrado que el contenido de agua del grano en sus etapas tempranas de desarrollo es un buen estimador del peso potencial del grano ya que el mismo se encuentra altamente correlacionado con la tasa de llenado de los granos. En esta tesis se demostró que la correlación entre el máximo contenido de agua y la tasa de llenado de granos tiene una misma base genética. Esta conclusión está basada en las figuras II.3 y II.5 donde se puede observar la correlación fenotípica positiva de ambos caracteres y la co-localización de los QTL estables a través de ambientes para estos dos caracteres, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se acepta la segunda hipótesis de esta tesis.

Hipótesis 3: *Las regiones genómicas vinculadas a cambios en la duración del llenado serán las mismas que se relacionen con la tasa de desecación de los granos y/o el porcentaje de humedad a madurez fisiológica.*

Además del efecto universal de la temperatura sobre la duración del período de llenado, este tiene un fuerte componente genético y estaría asociada a la velocidad de maduración del endosperma y al momento, expresado como porcentaje de humedad, en el cual los granos dejan de acumular biomasa. Por lo tanto genotipos con altas tasas de desecación o altos contenidos de humedad a madurez fisiológica presentan una duración de llenado más corta, y viceversa. En esta tesis se observó una relación negativa entre la duración del llenado y la tasa de desecación, sin observarse relación consistente con el contenido de humedad a madurez fisiológica (Figura II.4). En el análisis de QTL se detectó un QTL estable entre ambientes para tasa de desecación y duración de llenado de granos, que a su vez mostró efectos opuestos. Por otro lado, no se detectaron QTL en la misma posición para duración de llenado y humedad a madurez fisiológica (Figura II.5). Con estos resultados no es posible aceptar esta hipótesis, ya que se cumple parcialmente.

Hipótesis 4: *Dentro de los intervalos de confianza generados por los QTL detectados para crecimiento de grano existirán genes relacionados con los procesos de división y diferenciación celular.*

Los componentes fisiológicos de la determinación del peso de grano (tasa y duración de llenado) en maíz están vinculados a procesos de división y diferenciación celular. La tasa de llenado está asociada a la cantidad de células endospermáticas y de amiloplastos que se generan durante el proceso de división celular que tiene lugar al inicio del llenado de grano. Las células endospermáticas y los amiloplastos representan los destinos futuros para la acumulación de almidón, proteínas y aceite durante el llenado. A su vez representa el peso potencial del grano determinando de esta forma la tasa con que se llenarán los granos. Durante el llenado efectivo, tendrán lugar genes asociados a enzimas vinculadas a la generación de sacarosa y almidón, transportadores de azúcares y proteínas, acuaporinas entre otros. Por otro lado, la duración del período de llenado estará vinculada a la velocidad con la que se desequen los granos durante el llenado de los granos. Esta velocidad puede estar regulada positiva o negativamente a través del ABA. Es por eso que durante este proceso deben actuar genes vinculados al ciclo de esta hormona. En esta tesis se observó, a través de una búsqueda *in silico* de genes candidatos para los intervalos asociados a los QTL detectados en el capítulo II, la presencia de genes vinculados a la división y diferenciación celular. Estos genes actúan sobre las vías mencionadas anteriormente posiblemente afectando los procesos fisiológicos en cuestión.

Hipótesis 5: *Existe una alta correlación entre los desempeños de líneas parentales e híbridos derivados debida a una relativamente alta heredabilidad que muestran los caracteres de llenado.*

Los estudios de correlación entre el desempeño del promedio de los parentales y el de sus híbridos derivados representa información útil para el mejoramiento. Estos ayudan a determinar protocolos de fenotipeado para los caracteres de interés y la necesidad de realizar cruzamientos para la conducción de extensos ensayos de híbridos simples en caso de que exista la necesidad de hacer evaluaciones en híbridos. Correlaciones positivas entre líneas parentales y sus híbridos derivados permite reducir costos, aumentando así la eficiencia del programa de mejoramiento. Las correlaciones positivas observadas en esta tesis entre las líneas parentales y los híbridos para todos los caracteres de llenado agregan información relevante debido a que el desempeño de estos caracteres en líneas parentales es indicativo del desempeño que tendrá el híbrido derivado. Estos resultados permiten aceptar la cuarta hipótesis de esta tesis.

Investigaciones futuras

Si bien parte de los QTL detectados en la población biparental IBM Syn4 fueron estables y se expresaron con efectos similares independientemente del ambiente explorado no está claro si los mismos son estables ante cambios en el contexto genético. Esto significa que un QTL favorable asociado a la presencia del alelo correspondiente a un parental determinado puede modificar su efecto cuando este parental se cruza con otro, i.e. se modifica el fondo genético. Esto se debe al contexto genético mencionado y a la posible interacción con otros QTL o epistasis (Bernardo, 2008). Este efecto es conocido como interacción QTL x contexto genético y ha mostrado una gran incidencia en caracteres complejos en maíz (Blanc et al., 2006). Una forma de detectar este tipo de interacción es utilizando poblaciones interconectadas con un parental común. Así, para continuar con el estudio de las bases genéticas que determinan al peso de grano en maíz será necesario desarrollar y evaluar poblaciones interconectadas que contengan un parental en común con el parental Mo17 de la población IBM Syn4. Permitirá probar la existencia de interacción de los QTL con el fondo genético para los caracteres del llenado de grano. A su vez permitirá realizar un análisis de QTL más robusto debido al aumento en la cantidad de genotipos (y por lo tanto de alelos) a evaluar, alcanzando de esta forma resultados más precisos. Otra alternativa para aumentar la cantidad de alelos estudiados y así poder evaluar la interacción

con el fondo genético es utilizar paneles de asociación. Estos están constituidos por líneas puras que pueden tener distinto origen y/o distintas características aportando distintos alelos y aumentando de esta forma la variabilidad explorada.

Una vez que se detecten QTL para los caracteres de llenado en las poblaciones combinadas y/o en los paneles de asociación se podrá realizar una búsqueda de los genes que se localizan en esas regiones cromosómicas. De esta forma se podrán proponer genes candidatos de acuerdo al proceso fisiológico en el cual están involucrados, al igual que en el Capítulo II de la presente tesis. Sobre estos genes candidatos se deberá llevar a cabo una prueba funcional en la cual se podría reemplazar un nucleótido por su variante. Esta prueba se puede realizar con la tecnología de silenciamiento y/o con la caracterización de mutantes de la especie (Glazier et al., 2002). Mientras que la primera técnica consiste en noquear el gen de interés, la segunda técnica consiste en seleccionar genotipos mutantes para el gen de interés. Independientemente de la técnica a utilizar, el concepto radica en la pérdida total o parcial de funcionalidad del gen de interés para luego realizar una caracterización comparativa para el carácter de interés entre el genotipo *wild type* (control) y el genotipo mutante. En caso de existir diferencias genotípicas, se podrá afirmar que el gen seleccionado dentro de ese QTL es el responsable de cambios en el carácter de llenado evaluado.

Otra alternativa para validar los QTL detectados en esta población de RILs es a través de la generación de líneas isogénicas (NILs de su sigla en inglés). La generación de estas líneas consiste en cruzar una línea que porte el alelo de interés para un QTL determinado con el otro parental sucesivas veces hasta contar con líneas cuyo contexto genético sea el del padre recurrente excepto por la región donde se localiza el QTL de interés. De esta forma se estará eliminando el ruido generado por el fondo genético ya que el mismo tendrá los alelos de una sola línea excepto por la región de interés. Luego se deberá realizar una comparación fenotípica de estas líneas isogénicas con el parental que no posee el alelo de interés para el QTL en cuestión. Existen trabajos que muestran este extenso trabajo y cuyos resultados no son lo promisorios que se esperaba en un principio (Zhang et al., 2013). Esto puede estar asociado a que los caracteres de naturaleza cuantitativa están determinados por una gran cantidad de genes con pequeños efectos sobre el fenotipo final y a que estos genes interactúan entre sí y con otros genes que tal vez no estén directamente asociados a la determinación del carácter en cuestión. Por lo tanto, uno esperaría que al modificar un solo gen o región genómica no debería generar grandes cambios a nivel fenotípico.

La correlación entre los desempeños de las líneas parentales y los híbridos derivados para los caracteres de llenado evaluados en el Capítulo III tiene una gran relevancia para los programas de mejoramiento de maíz. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados replicando estos experimentos en distintos ambientes de forma tal de corroborar la estabilidad de los caracteres de llenado en líneas e híbridos derivados ante cambios ambientales. Además, para evitar sesgos en la partición de la variancia genética será necesario utilizar un mayor número de líneas parentales, tanto hembras como machos. De esta forma, al aumentar la variabilidad genética, a través del agregado de un mayor número de líneas, se podrán probar un mayor número de combinaciones que reducirán el sesgo, generando resultados más precisos. Otra alternativa sería utilizar la población evaluada en el capítulo II cruzandola contra dos o más líneas testers. Si bien se generarían experimentos de una magnitud difícil de manejar sería otra forma de confirmar la utilidad de los resultados en el capítulo II.

Conclusiones finales:

Los estudios realizados en este trabajo de tesis estuvieron dirigidos a detectar las bases genéticas que están detrás de la determinación del peso de grano en maíz a través de la disección del carácter en sus componentes determinantes, y a determinar el grado de aplicación de estos resultados sobre híbridos al evaluar la asociación existente entre las líneas parentales y los híbridos derivados.

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis se puede arribar a las siguientes conclusiones:

- Los mecanismos que determinan el peso de los granos en maíz, tasa y duración de llenado, tienen una base genética distinta, o sea que son mecanismos independientes cuya determinación depende de distintas regiones genómicas y/o de distintos genes.
- La determinación del peso de grano estuvo mayormente explicada por variaciones en la tasa de llenado que en la duración de llenado. A su vez, las regiones genómicas asociadas al peso de grano co-localizaron con las de tasa de llenado y máximo contenido de agua.
- Cambios en la tasa de llenado estuvieron asociados a las mismas regiones genómicas responsables de cambios en el máximo contenido de agua en los granos.

- Las regiones genómicas vinculadas a cambios en duración de llenado estuvieron asociadas a las mismas regiones vinculadas con la tasa de desecación durante el llenado.
- El desempeño en líneas parentales e híbridos derivados para peso de grano y los caracteres de llenado de grano en maíz están positivamente correlacionados. Esto permite seleccionar líneas con valores deseables para caracteres de llenado sin la necesidad de evaluar una gran cantidad de cruzamientos.

Referencias

- Abertondo, V.J., 2007. Phenotypic analysis of intermated B73 x Mo17 (IBM) population. M.Sc. Thesis, Iowa State University, USA.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Andorf, C.M., Lawrence, C.J., Harper, L.C., Schaeffer, M.L., Campbell, D.A., Sen, T.Z., 2010. The Locus Lookup tool at MaizeGDB: identification of genomic regions in maize by integrating sequence information with physical and genetic maps. *Bioinformatics* 26, 434-436.
- Austin, D. F. and Lee, M. 1996. Comparative mapping in F2:3 and F6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield component in maize. *Theor. Appl. Genet.* 92:817-826.
- Austin, D.F. and Lee, M. 1998. Detection of quantitative trait loci and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. *Crop Science* 38:1296-1308.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B., 2004. QTL Cartographer, Version 1.17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Berke, T. G. and Rocheford, T. R. 1995. Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. *Crop Sci.* 35:1542-1549.
- Bernardo, R., 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: Learning from the last 20 years. *Crop Sci.* 48, 1649-1664.
- Bewley, J.D., Black, M. 1985. *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum, New York.
- Bingham, I.J., Blake, J., Foulkes, M.J., Spink, J., 2007. Is barley yield in the UK sink limited?: II. Factors affecting potential grain size. *Field Crops Res.* 101, 212-220.

- Blanc G., Charcosset, A., Mangin, B., Gallais, A., Moreau, L. 2006. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 113:206-224.
- Borevitz, J.O., Maloof, J.N., Lutes, J., Dabi, T., Redfern, J.L., Trainer, G.T., Werner, J.D., Asami, T., Berry, C.C., Weigel, D., Chory, J., 2002. Quantitative trait loci controlling light and hormone response in two accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 160, 683-696.
- Borrás, L.; Westgate, M. E. and Otegui, M. E. 2003. Control of kernel weight and kernel water relations by post-flowering source-sink ratio in maize. *Annals of Botany*. 91:857-867.
- 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 Research* 86:131-146.
- Borrás, L., Westgate, M.E. 2006. Predicting maize kernel sink capacity early in development. *Field Crops Research* 95:223-233.
- Borrás, L., Zinselmeier, C., Senior, L.M., Westgate, M., Muszynski, M. 2009. Characterization of grain filling patterns in diverse maize germplasm. *Crop Science* 49:999-1009.
- Borrás, L., and B.L. Gambín. 2010. Trait dissection of maize kernel weight: Towards integrating hierarchical scales using a plant growth approach. *Field Crops Res.* 118:1-12.
- Brocklehurst, P.A. 1977. Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* 266:348-349.
- Calderini, D.F., Abeledo, L.G., Slafer, G.A., 2000. Physiological maturity in wheat based on kernel water and dry matter. *Agron. J.* 92, 895-901.
- Capelle, V., Remoué, C., Moreau, L., Reyss, A., Mahé, A., Massonneau, A., Falque, M., Charcosset, A., Thévenot, C., Rogowsky, P., Coursol, S., Prioul, J.L., 2010. QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in maize kernels. *BMC Plant Biol.* 10, 2-22.

- Capitano, R., Gentinetta, E., Motto, M. 1983. Grain weight and its components in maize inbred lines. *Maydica* 28:365-379.
- Cassman, K.G. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 96:5952-5959.
- Chavas, J.P., Kim, K., Lauer, J.G., Klemme, R.M., Bland, W.L. 2001. Economic analysis of corn yield, profitability and risk at the edge of the corn-belt. *Journal of Agricultural and Resource Economics* 26:230-247.
- Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B. and 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.
- Cross, H.Z. 1975. Diallel analysis of duration and rate of grain filling of seven inbred lines of corn. *Crop Sci.* 15:532-535.
- Daynard, T.B., J.W. Tanner, and W.G. Duncan. 1971. Duration of the grain filling period and its relation to grain yield in corn, *Zea mays* L. *Crop Sci.* 11:45-48.
- Delucchi, C., G.H.Eyhérabide, R.D. Lorea, D.A.Presello, M.E.Otegui, and C.G.López. 2012. Classification of argentine maize landraces in heterotic groups. *Maydica*. 57:26-33.
- Duvick, N.D., J.S.C. Smith, and M. Cooper. 2004. Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. *Plant Breeding Rev.* 24:109-151.
- Early, E.B. McIlrath, W.O., Seif, R.D., 1967. Effects of shade applied at different stages of plant development in corn (*Zea mays* L.) production. *Crop Science* 7, 151-156.
- Eathington, S.R., Crosbie, T.M., Edwards, M.D., Rieter, R.S., Bull, J.K., 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Sci.* 47, S154-S163.
- FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org.
- Fischer, R.A. 1975. Yield potential in a dwarf spring wheat and the effect of shading. *Crop Science* 29:732-735.

- Frova, C., Krajewski, P., di Fonzo, N., Villa, M., Sari-Gorla, M. 1999. Genetic análisis of drought tolerante in maize by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99:280-288.
- Gambín, B.L., Borrás, L. 2005. Sorghum kernel weight: growth patterns from different positions within the panicle. *Crop Science* 45, 553-561.
- Gambín, B., Borrás, L. 2007. Plasticity of sorghum kernel weight to increased assimilate availability. *Field Crops Research* 100:272-284.
- Gambín, B., Borrás, L., Otegui, M. 2006. Source-sink relations and kernel weight differences in maize temperate hybrids. *Field Crops Research* 95:316-326.
- Gambín, B., Borrás, L., Otegui, M. 2007. Kernel water relations and duration of grain filling of maize temperate hybrids. *Field Crops Research* 101:1-9.
- Gambín, B.L., Borrás, L., 2011. Genotypic diversity in sorghum inbred lines for grain-filling patterns and other related agronomic traits. *Crop & Pasture Sci.* 62, 1026-1036.
- Gama, E.E.G., and A.R. Hallauer. 1977. Relation between inbred and hybrids traits in maize. *Crop Sci.* 17:703-706.
- Garcia, D., Saingery, V., Chambrier, P., Mayer, U., Jurgens, G., Berger, F., 2003. *Arabidopsis haiku* mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiol.* 131, 1661-1670.
- Glazier, A.M, Nadeau, J.H., Aitman, T.J. 2012. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298:2345-2349.
- Gonzalo, M.; Holland, J. B.; Vyn, T. J. and McIntyre, I. m. 2010. Direct mapping of density response in a population of B73 x Mo17 recombinant inbred lines of maize (*Zea Mays* L.). *Heredity.* 104:583-599.
- Guo, J., Chen, Z., Liu, Z., Wang, B., Song, W., Li, W., Chen, J., Dai, W., Lai, J., 2011. Identification of genetic factors affecting plant density response through QTL mapping of yield component traits in maize (*Zeamayz* L.). *Euphytica* 182, 409-422.

- Guo, J., Yang, X., Weston, D.J., Chen, J.G., 2011. Abscisic acid receptors: Past, present and future. *J. Integr. Plant Biol.* 53, 469-479.
- Hallauer, A.R., Miranda, J.B., 1988. Quantitative genetics in maize breeding, 2nd edition. Iowa State University Press, Ames.
- Hammer, G.L., Sinclair, T.R., Chapman, S.C. and van Oosterom, E. 2004. On systems thinking, systems biology, and the in silico plant. *Plant Physiology*.134:909-911.
- Holland, J.B., D.V. Uhr, D. Jeffers, and M.M. Goodman. 1998. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 96:232-241.
- Holland, J.B., W.E. Nyquist, and C.T. Cervantez-Martinez. 2003. Estimating and interpreting heritability for plant breeding: An update. In: J. Janick, editor, *Plant breeding. Rev.* vol. 22. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. p. 9-112.
- Jiang, C., Zeng, Z.B., 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140, 1111-1127.
- Jones, R.J., Roessler, J., Quattar, S. 1985. Thermal environment during endosperm cell division in maize: Effects on number of endosperm cells and starch granules. *Crop Sci.* 25:830-834.
- Jones, R.J., Schreiber, B.M.N., Roessler, J.A. 1996. Kernel sink capacity in maize: genotypic and environmental regulation. *Crop Science* 36:301-306.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137:165-177.
- Jones, J.W., Hoogenboom, G., Porter, C.H., Boote, K.J., Batchelor, W.D., Hunt, L.A., Wilkens, P.W., Singh, U., Gijsman, A.J., Ritchie, J.T., 2003. The DSSAT cropping system model. *Eur. J. Agron.* 18, 235-265.
- 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. and Pooni, H. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Chapman and Hall. London.
- Kebede, A.Z., Melchinger, A.E., Cairns, J.E., Araus, J.L., Makumbi, D., Atlin, G. 2013. Relationship of line per se and testcross performance for grain yield of tropical maize in drought and well-watered trials. *Crop Science* 53:1-9.
- Kosambi, D.D., 1943. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Hum. Genet.* 12, 172-175.
- Lande, R., Thompson, R., 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756.
- Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199 (Correction 136:705).
- 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. 2005. Molecular genetics research on the germplasm bases and quantitative traits in popcorn. PhD thesis, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China.
- Li, Y. L.; Dong, Y. B.; Niu, S. Z.; Cui, D. Q.; Wang, Y. Z.; Liu, Y. Y. and Wei, M. G. 2007. Identification of trait-improving quantitative trait loci for grain yield components from a dent corn inbred line in an advanced backcross BC2F2 population and comparison with its F2:3 population in popcorn. *Theor. Appl. Genet.* 115:129-140.
- Li, Y., Yang, M., Dong, Y., Wang, Q., Zhou, Q., Shen, B., Zhang, F., Liang, X., 2012. Three main genetic regions for grain development revealed through QTL detection and meta-analysis in maize. *Mol. Breeding* 30, 195-211.
- Liu, Z.H., H.Q. Ji, T.T Cui, X. Wu, L.J. Duan, X.X. Feng, and J.H. Tang. 2011. QTL detected for grain-filling rate in maize using a RIL population. *Mol. Breeding* 27:25-36.

- 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.
- Lynch, M., and B. Walsh. 1997. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer, Sunderland, MA.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., Bonhomme, R. 1998. Grain yield components in maize. II. Post-silking growth and kernel weight. *Field Crops Research* 56:257-264.
- 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.
- Melchinger, A.E., Utz, H.F., Schön, C.C., 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149, 383-403.
- Messmer, R., Fracheboud, Y., Bänziger, M., Stamp, P., Ribaut, J.M., 2011. Drought stress and tropical maize: QTLs for leaf greenness, plant senescence, and root capacitance. *Field Crops Research* 124,93-103.
- Mikel, M.A., Dudley, J.W., 2006. Evolution of North American dent corn from public to proprietary germplasm. *Crop Sci.* 46, 1193-1205.
- Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca. Sistema integrado de información agropecuaria. 2013. www.sija.gov.ar.
- Mihaljevic, R., Schön C.C., Utz, H.F., Melchinger, A.E. 2005. Correlations and QTL correspondence between line per se and testcross performance for agronomic traits in four populations of European maize. *Crop Science* 45:114-122.
- Möhring, J., A.E. Melchinger, and H.P. Piepho. 2011. REML-based diallel analysis. *Crop Sci.* 51:470-478.
- Moon, J., Parry, G., Estelle, M., 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 16, 3181-3195.

- Muchow, R.C., 1990. Effect of high temperature on grain-growth in field grown maize. *Field Crops Res.* 23, 145-158.
- Munaro, E.M., K.E. D'Andrea, M.E. Otegui, A.G. Cirilo, and G.H. Eyh rabide. 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.
- Patrick, J.W., Offler, C.E., 2001. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *J. Exp. Bot.* 52, 551–564.
- 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.* 7, 1305-1320.
- Piepho, H.P., 2005. Statistical tests for QTL and QTL-by-environment effects in segregating populations derived from line crosses. *Theor. Appl. Genet.* 110, 561-566.
- Prioul, J.L., Jeannette, E., Reyss, A., Gr gory, N., Giroux, M., Hannah, L.C., Causse, M., 1994. Expression of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize (*Zea mays* L.) grain and source leaf during grain filling. *Plant Physiol.* 104, 179-187.
- Poneleit, C.G., and D.B. Egli. 1979. Kernel growth rate and duration in maize as affected by plant density and genotype. *Crop Sci.* 19:385-388.
- Poneleit, C.G., and D.B. Egli. 1983. Differences between reciprocal crosses of maize for kernel growth characteristics. *Crop Sci.* 23:871-875.
- Radushev, D., 2007. Graph Pad Prism version 5.0. Graph Pad Software, Inc.
- Reddy, V.M., Daynard, T.B. 1983. Endosperm characteristics associated with rate of grain filling and kernel size in corn. *Maydica* 28:339-355.
- Reymond, M. Muller, B., Leonardo, 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 Physiology* 131:664-675.
- Ribaut, J.M., Jiang, C., Gonzalez 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.
- Rivero, R. M.; Kojima, M.; Gepstein, A.; Sakakibara, H.; Mittler, R.; Gepstein, S. and Blumwald, E. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant.
- Rojas, B.A., and G.F. Sprague. 1952. A comparison of variance components in corn yield trials: III. General and Specific combining ability and their interaction with locations and years. *Agron. J.* 44:462-466.
- Rondanini, D.P., R. Savin, and A.J. Hall. 2007. Estimation of physiological maturity in sunflower as a function of fruit water concentration. *Europ.J.Agron.* 26:295-309.
- Rondanini, D.P., Mantese, A.I., Savin, R., Hall, A.J., 2009. Water content dynamics of achene, pericarp and embryo in sunflower: Associations with achene potential size and dry-down. *Eur. J. Agron.* 30, 53-62.
- Rosche, E.G., Blackmore, D., Offler, C.E., Patrick, J.W., 2005. Increased capacity for sucrose uptake leads to earlier onset of protein accumulation in developing pea seeds. *Func. Plant Biol.* 32, 997-1007.
- Sadras, V. O. 2007. Evolutionary aspects of the trade-off between seed size and number in crops. *Field Crops Research.* 100: 125-138.
- Sadras, V.O., and G.A. Slafer. 2012. Environmental modulation of yield components in cereals: heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. *Field Crops Res.* 127:215-224.
- Saini, H.S., Westgate, M.E. 2000. Reproductive development in grain crops during drought. *Advances in Agronomy* 68:59-96.

- Sala, R. G.; Andrade, F. H.; Camadro, E. L. and Ceron, J. C. 2006. Quantitative trait loci for grain moisture at harvest and field grain drying rate in maize (*Zea Mays*, L.). *Theor. Appl. Genet.* 112:462-471.
- Santiago, J., Rodriguez, A., Saez, A., Rubio, A., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S-Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., 2009. Modulation of drought resistance by abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant J.* 60, 575-588.
- Sampedro, J., Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 6, 242.
- SAS Institute, 1999. The SAS Online Doc v. 8. SAS Inst, Cary, NC.
- Schön, C. C.; Melchinger, A. E.; Boppenmaier, J.; Brunklaus-Jung, E.; Herrman, R. G. and Seitzer, J. F. 1994. RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting testcross performance of elite European flint lines. *Crop Sci.* 34:378-389.
- Schnable, P.S., et al., 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. *Science* 326, 1112–1115.
- Schnyder, H., and U. Baum. 1992. Growth of the grain of wheat (*Triticum aestivum* L.). The relationship between water content and dry matter accumulation. *Europ. J. Agron.* 1:51-57.
- Shaw, R.H., and W.E. Loomis. 1950. Bases for the prediction of corn yields. *Plant Physiol.* 25:225-244.
- Schwarz, G., 1978. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461-464.
- Setter, T., Flannigan, B.A. 2001. Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. *Journal of Experimental Botany* 52:1401-1408.
- Singh, S., Hernandez, M. V., Crossa, J., Singh, P.K., Bains, N. S., Singj, K., Sharma, I., 2012. Multi-Trait and Multi-Environment QTL Analyses for Resistance to Wheat Diseases. *PLoS ONE* 7, 1-12.
- Slafer, G.A., 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142, 117-128.

- Song, X.J., Huang, W., Shi, M., Zhu, M.Z., Lin, H.X., 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics* 39, 623-630.
- Swank, J.C., Egli, D.B., Pfeiffer, T.W., 1987. Seed growth characteristics of soybean genotypes differing in duration of seed fill. *Crop Sci.* 27, 85-89.
- Tardieu, F. and Tuberosa, T. 2010. Dissection and modeling of abiotic stress in plants. *Curr. Op. in Plant Biol.* 13:206-212.
- Uauy, C.; Distelfeld, A.; Fahima, T.; Blechl, A. and Dubcovsky, J. 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat. *Science.* 314:1298-1301.
- USDA-ARS National Genetic Resources Program. 2005. Germplasm Resources Information Network (GRIN) database National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD. http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html (accessed 18 Jan. 2012).
- Wang, G., M.S. Kang, and O. Moreno. 1999. Genetic analyses of grain-filling rate and duration in maize. *Field Crops Res.* 61:211-222.
- Wang, A., Garcia, D., Zhang, H., Feng, K., Chaudhury, A., Berger, F., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Luo, M., 2010. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis. *The Plant J.* 63, 670-679.
- Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.B., 2011. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Weber, H., Borosjuk, L., Wobus, U., 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56, 253–279.
- Yin, X. and Struik, P. C. 2008. Applying modeling experiences from the past to shape crop system biology: the need to converge crop physiology and functional genomics. *New Phytologist.* Review 1-14.

- Young, T.E., Gallie, D.R., 2000a. Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 42, 397–414.
- Young, T.E., Gallie, D.R., 2000b. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 44, 283–301.
- Zalapa, J.E., Staub, J.E., McCreight, J.D., Chung, S.M., Cuevas, H., 2007. Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US western shipping melon germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 114, 1185-1201.
- Zhang, G., Wang, X., Wang, B., Tian, Y., Li, M., Nie, Y., Peng, Q., Wang, Z. 2013. Fine mapping a major QTL for kernel number per row under different phosphorus regimes in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126, 1545-1553.