



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

TÍTULO DE TRABAJO DE TESIS:

**“ANÁLISIS DE LA MERMA DE RENDIMIENTO DE LA LÍNEA A DE MAÍZ (*Zea mays*
L.) EN SU VERSIÓN HP ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES”**

NOMBRE Y APELLIDO DEL AUTOR:

MARÍA EUGENIA COMETTI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

DIRECTOR: ANA PAULA CANU, MSc.

AÑO: 2014

“ANÁLISIS DE LA MERMA DE RENDIMIENTO DE LA LÍNEA A DE MAÍZ (*Zea maize* L.) EN SU VERSIÓN HP ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES”

María Eugenia Cometti

Ingeniera Agrónoma- Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética vegetal, 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 Colón, Bs As, durante el período comprendido entre octubre 2009 y octubre 2012, bajo la dirección de Ana Paula Canu.

Nombre y firma del Maestrando

Nombre y firma del Director

Defendida:de 20__.

INDICE

INDICE	2
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCION	7
HIPÓTESIS:.....	11
OBJETIVOS:.....	11
Generales.....	11
Específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	25
FUENTES Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXO I: Tablas y Figuras de la Sección Resultados.....	29
ANEXO II: Análisis Estadísticos	50
*Ensayo Comparativo de Rendimiento de Líneas1a y 1b:.....	50
*Ensayo Comparativo de Rendimiento de Líneas2a y 2b:.....	50
Test de Comparación de medias para los dos grupos de plantas seleccionados (alto y bajo rendimiento):	51
ANEXO III: Fotografías.....	52

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico. Es la molécula que lleva la información genética utilizada por la célula para la creación de proteínas. La función principal es el almacenamiento a largo plazo de la información genética (material hereditario).
- ASI: del inglés “Anthesis Silking Interval”, que significa intervalo de tiempo entre floración masculina (liberación del polen) y floración femenina (salida de estigmas). Es una variable medible para caracterizar materiales.
- CV: coeficiente de variación. Es un estimador estadístico que hace referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable medida.
- HP: se le dice al material que contiene un evento transgénico denominado TC1507, el cual otorga resistencia a lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio. El nombre comercial del evento es Herculex.
- HR: se le dice al material que contiene dos eventos transgénicos denominados: NK603, el cual otorga tolerancia a glifosato y TC1507 mencionado más arriba. El nombre comercial del evento NK603 es Round up Ready.
- LA: Línea A convencional o sin ningún evento transgénico. Es una línea elite de maíz del grupo heterótico SSS (Stiff Stalk Synthetic).
- LAHP: versión de la Línea A con el evento transgénico TC1507.
- LAHR: versión de la Línea A con dos eventos transgénicos: TC1507 y NK603.
- LAHR/HP: Línea obtenida del cruzamiento entre la línea A HR y la Línea A HP.
- NGS: en inglés “Next Generation Sequencing”, o secuenciación de segunda generación. Es el método de secuenciación utilizado para analizar molecularmente a las líneas parentales: LA, LAHP y LAHR.
- NILs: en inglés “Near Isogenic Lines”, cuya traducción al castellano es líneas casi isogénicas. Se utiliza para denominar a aquellas líneas que difieren entre ellas solamente en uno o en pocos genes.

- RFLP: en inglés “restriction fragment length polymorphism”, cuya traducción al castellano es polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción. Son marcadores moleculares.
- SNPs: en inglés “single nucleotide polymorphisms”. Estos son polimorfismos de un gen que ocurren por variación en una letra (nucleótido) en la secuencia de ADN. Son marcadores moleculares.
- SSRs: en inglés “simple sequence repeat”, son marcadores moleculares conocidos como micro satélites. Son secuencias de ADN en las que un fragmento (cuyo tamaño va desde dos hasta seis pares de bases) se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos.
- SSS: en inglés “stiff stalk synthetic”. Es el grupo heterótico al que pertenece la línea elite A.

RESUMEN

La versión HP de la línea A presenta una merma de rendimiento bajo condiciones de estrés cuando se la compara con la versión no transgénica. La versión HR de la línea A no presenta este fenómeno. Para poder encontrar los fragmentos cromosómicos responsables y obtener una nueva línea sin la merma, la línea A HR se cruzó con la línea A HP asumiendo que las progenies eran líneas casi isogénicas (NILs) que diferían en unos pocos genes que podrían explicar la merma. Estas líneas fueron sembradas en el campo en dos ambientes. De acuerdo a los resultados de rendimiento, fueron seleccionadas las 10 mejores y las 10 peores líneas. Los parentales fueron secuenciados y como resultado se seleccionaron algunos SNPs para genotipificar las 20 NILs. A partir de la secuenciación se observó que la línea A HR tenía muchas nuevas regiones que eran diferentes a ambas versiones de la línea A: tanto convencional como HP. No se observaron diferencias alélicas entre las 10 mejores y las 10 peores NILs (o fragmentos candidatos) que pudiesen explicar la merma en rendimiento. La similitud entre las versiones HP y HR en el cromosoma dos (donde está inserto en evento TC1507) sugiere que la merma no es causada por arrastre de ligamiento. Sin embargo, el arrastre por ligamiento no puede ser descartado ya que otros fragmentos presentes en la versión HR en otras regiones genómicas podrían estar compensando la pérdida. Fue encontrada una versión HP con un mayor rendimiento pero no los fragmentos candidatos.

ABSTRACT

“Yield loss analysis of the line A of corn (*Zea mays* L.) in its HP version assisted by molecular markers.”

The HP version of the line A shows a yield loss under stressful conditions when compared to the non transgenic version. The line A HR does not show this issue. So as to be able to find the chromosomal pieces responsible and to obtain a new HP version without the loss, the line A HR was crossed with the line A HP assuming that the progenies were near isogenic lines (NILs) differing only in some genes that could explain the yield loss. They were planted in the field in two environments. According to the yield performance, the ten best and the ten worst NILs were selected. The parents were sequenced and as a result some SNPs were selected to genotype the 20 NILs. It was observed that the HR version had a lot of new regions, different to both HP and conventional line A. Not allelic differences (or candidate fragments) were found between the best and the worst NILs that could explain the yield loss. The similarity between HP and HR version in chromosome two (where TC1507 is inserted) suggests that the yield is not caused by linkage drag. However, the linkage drag cannot be discarded since other fragments present in the HR version in other genomic regions could be compensating the loss. An HP version with higher yield was found but not the candidate fragments.

INTRODUCCION

En la actualidad, para la producción de híbridos de maíz con eventos transgénicos se incorporan los mismos en una de las líneas parentales mediante sucesivas retrocruzas entre ella (padre recurrente) y una línea fuente del transgen (o donante). La progenie segregante obtenida del cruzamiento entre la línea donante y la línea recurrente es un mosaico de piezas cromosómicas derivadas de ambos padres y pueden acarrear no solo genes deseados sino también no deseados del padre donante (Tanksley *et al.*, 1989).

Adicionalmente, en las retrocruzas el arrastre de alelos del padre donante ligados al transgen puede hacer que se fijen genes del donante en la línea modificada. Incluso después de 20 retrocruzas, se espera encontrar una pieza del cromosoma donante (diez centiMorgan o unidades) todavía ligada al gen que está siendo seleccionado. En la mayoría de los genomas vegetales diez centiMorgan es suficiente ADN para contener cientos de genes. Este fenómeno ha sido llamado "Arrastre por ligamiento" y puede resultar en una nueva variedad modificada para caracteres distintos de los elegidos. (Tanksley *et al.*, 1989). Por lo tanto, el retrocruzamiento da como resultado la transferencia de genes de interés más otros genes adicionales.

Desde la aparición de marcadores de ADN, los programas de mejoramiento de cultivos han confiado fuertemente en marcadores moleculares para acelerar la ganancia genética en el mejoramiento vegetal. La conversión de líneas a través de la selección asistida por marcadores ha revolucionado al mejoramiento vegetal en términos de fidelidad de recuperación del genoma recurrente, costo, efectividad y velocidad (Agarbar *et al.*, 2010). Comparado con la retrocruza tradicional, el uso de marcadores de ADN ofrece dos ventajas:

- Recuperación más rápida del genotipo recurrente. En otras palabras, los marcadores pueden ser usados para seleccionar negativamente el genoma del padre donante. (Collard y Mackill, 2006)
- Selección más eficiente de genotipos que tienen eventos de recombinación cerca del gen objetivo (Ribaut y Hoisington, 1998) y minimización del arrastre por ligamiento.

Si se compara el mejoramiento por retrocruza tradicional y la selección asistida por marcadores en términos de recuperación del genoma recurrente en regiones no ligadas a un gen de interés se obtiene como resultado que la selección asistida por marcadores

alcanza una conversión completa en solo tres retrocruzas comparado con un mínimo de seis para selección convencional (Ribaut *et al*, 1998). Si la comparación entre ambas se realiza en regiones ligadas al gen de interés la diferencia es aún más marcada. La selección asistida por marcadores alcanza el mismo nivel de conversión en solo dos retrocruzas comparado con lo que sería alcanzado en 100 retrocruzas por métodos tradicionales (Ribaut *et al*, 1998).

Herculex es el nombre comercial del evento transgénico denominado TC1507 el cual fue el resultado de desarrollo e investigación conjunto de Dow Agrosiences y Pioneer HI. El mismo es un fragmento de ADN con dos genes, los cuales expresan las proteínas Cry1F (que otorga protección contra algunos lepidópteros de importancia como el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y el barrenador del tallo, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidóptera: Crambidae)) y Pat (que otorga tolerancia a glufosinato de amonio). El evento se encuentra inserto en el cromosoma dos, en la posición 120 según el mapa de ligamiento de Dow Agrosiences. Las versiones con TC1507 se denominan HP.

Round up ready es el nombre comercial del evento NK603. Es un fragmento de ADN con un solo gen que expresa la EPSPs modificada que otorga tolerancia al Glifosato.

La línea A HR presenta dos eventos transgénicos: NK603 y TC1507. El evento NK603 se encuentra inserto en el cromosoma seis y el evento TC1507 se encuentra inserto en el cromosoma dos. Las versiones que poseen ambos eventos: NK603 y TC1507 se denominan HR.

La línea A es una línea elite del grupo heterótico SSS (Stiff Stalk Synthetic). Su versión plana o no transgénica se denomina convencional. Su versión transgénica con el evento TC1507 se denomina HP y presenta un menor rendimiento de la línea *per se* comparada con la versión no transgénica, lo que incrementa notablemente los costos de producción de híbridos al usarla como hembra. Se asume que no es un efecto del evento TC1507, ya que existen numerosas conversiones de líneas a este transgen que no mostraron este efecto (Bing, J. *comunicación personal*). El mismo autor, en un estudio especialmente diseñado para tal fin y realizado en 2005 en 18 ambientes, no encontró diferencias significativas en el comportamiento agronómico de dos materiales en su versión convencional y HP (Bing, J. 2005. *Publicación interna de Dow*). Por lo anteriormente descrito, se asume que el problema está asociado al proceso de conversión.

La versión HR de la línea no presenta este problema, observándose un rendimiento de la línea *per se* comparable a la convencional, como surge de analizar datos de rendimientos

históricos. En la tabla 2, (A. P. Canu y J. P. Raimondi, comunicación personal) por ejemplo se muestran los datos de la campaña 2007-2008. En 4 localidades no se observaron diferencias significativas entre versiones Convencional y HR. La versión HP mostró un rendimiento en número de bolsas significativamente menor a las otras dos versiones.

Material	Rendimiento (bolsas de híbrido)	
Línea A	155,98	A
Línea A HR	153,35	A
Línea A HP	115,25	B

Tabla 2: Resultados de 4 ensayos en los que se evaluó rendimiento de las distintas versiones de la línea A y se expresó en bolsas de híbrido producidas. Extraído de: J. P. Raimondi & A. P. Canu, estudio interno DAS. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

El menor rendimiento de la línea en su versión HP se explica por un mayor número de plantas sin espiga y a un mayor intervalo entre floración masculina y femenina (ASI, por sus siglas en inglés) y, según revela un estudio interno no publicado, esto sería causado por una mayor sensibilidad al estrés. Datos al respecto se pueden observar en la Tabla 1 y en la Figura3 (Walter Tanaka, comunicación personal.)

Versión de la Línea A	Rendimiento promedio (kg/ha)	
HR	4686.59	A
HP	3108.93	B

Tabla 1: Comparación de rendimiento promedio entre versión HR y HP de la línea A. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

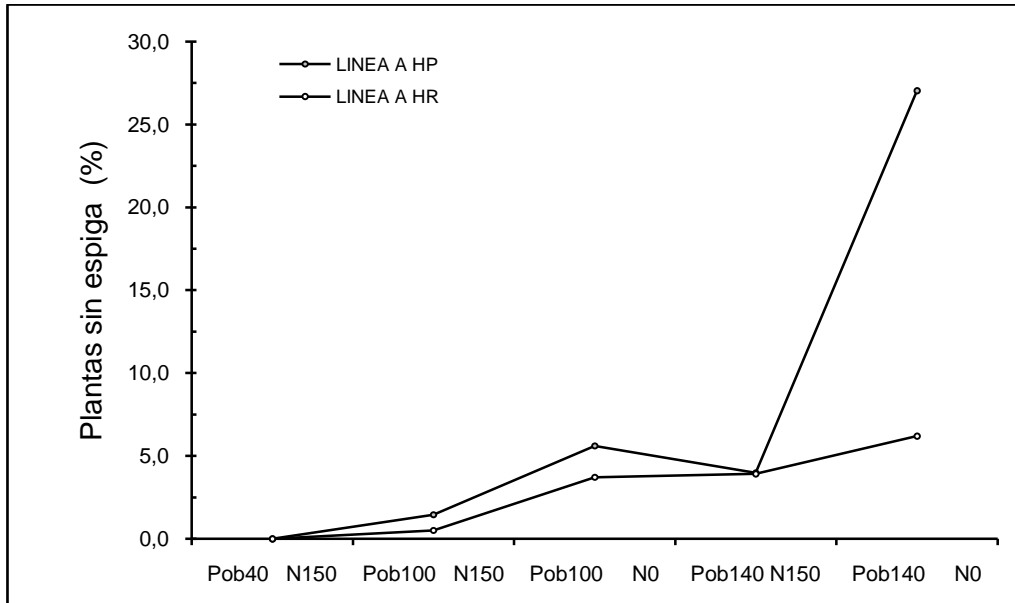


Figura 3: Porcentaje de plantas estériles de la línea A HP y HR bajo diferentes ambientes (dosis de Nitrógeno a la siembra: 0 & 150 y cantidad de plantas/ha: 40.000, 100.000& 140.000). Extraído de: Walter Tanaka, estudio interno DAS.

La conversión de la línea A a HP se realizó en el pasado, y fue asistida con marcadores moleculares del tipo SSR (micro satélite). Los mismos poseían una menor densidad de cobertura del genoma que otros marcadores usados en la actualidad y esto podría ser la causa de la presencia de fragmentos de ADN del padre donante causantes de la merma. Con el fin de detectar los fragmentos cromosómicos responsables del menor rendimiento en grano, y a la vez obtener una nueva versión HP sin el problema, se cruzó la versión HR con la HP. Se eligió esta cruce asumiendo que la versión HR de la línea A era una línea casi isogénica comparada con la versión convencional de la misma línea. Además, al cruzar la HP por la HR se obtendrían progenies con el evento TC1507 al estado homocigota lo cual facilitaría alcanzar uno de los objetivos.

Se asumió que los fragmentos cromosómicos responsables de la merma de rendimiento estarían segregando entre las progenies de la cruce HP x HR. Cualquier diferencia fenotípica en este carácter entre las progenies y la línea recurrente puede ser atribuida a este o estos fragmentos.

HIPÓTESIS:

El menor rendimiento de la línea A HP comparada con la misma línea convencional y HR frente a condiciones de estrés se debe al arrastre por ligamiento o fragmentos cromosómicos indeseables del donante en otras posiciones del genoma. Este efecto puede revertirse al eliminar dichos fragmentos.

OBJETIVOS:

Generales

Detectar los fragmentos cromosómicos que ocasionan la merma de rendimiento de la línea A en su versión HP y obtener una nueva versión HP sin esta merma.

Específicos

- Mapear los fragmentos cromosómicos responsables de la merma de rendimiento en la versión HP de la línea A.
- Determinar si se trata de fragmentos heredados por arrastre por ligamiento o si se encuentran en otra posición del genoma.
- Seleccionar nuevas versiones sin el o los fragmentos no deseados usando progenies de la cruce de la versión HP por la versión HR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener los resultados finales de esta tesis se llevaron a cabo una serie de pasos descritos en los párrafos que continúan.

En un campo de Dow en Molokai, Hawái, en Octubre del año 2009 se cruzó por método tradicional la versión HR por la versión HP de la línea A. La generación F1 resultante fue sembrada en Febrero del año 2010 en el mismo sitio y al momento de floración todas las plantas fueron auto fecundadas para obtener la generación F2.

Las espigas F2 fueron sembradas en Junio 2010 nuevamente en Molokai y las plantas fueron muestreadas para llevar a cabo un test de cigocidad con el fin de determinar el estado de homocigocidad o heterocigocidad de los eventos en cuestión. Todas las plantas resultaron homocigotas para el evento TC1507 tal cual lo esperado y se seleccionaron aquellas negativas para el evento NK603. Esas plantas seleccionadas fueron posteriormente auto fecundadas para generar la F3.

En Octubre de 2010 en la planta experimental de Dow en Colón, Buenos Aires, se sembró la F3 para incremento de semilla, obteniéndose semilla F4. La semilla de cada planta F3 perteneciente a la misma familia fue cosechada en conjunto, dando origen a las F3:4.

En Noviembre 2011 en el mismo campo de la planta experimental de Dow Agrosiences fueron sembradas las F3:4 (276 familias distintas) junto con los parentales de la cruce original (HP y HR) y la versión convencional de la línea A, funcionando como testigos para el experimento. El objetivo fue realizar un ensayo comparativo de rendimiento de líneas en dos ambientes distintos los cuales se lograron generando diferentes condiciones de estrés de manera artificial. El diseño experimental elegido para cada ensayo fue el de bloques completos al azar.

Para la siembra se utilizó una sembradora neumática con una distribución muy homogénea de la semilla. Cada unidad experimental consistió en un surco de 2 metros de largo con 4 semillas por metro con 0.70 m de espaciamiento entre surcos. Se realizaron dos ensayos separados (Tabla 3): uno con más repeticiones que incluyó a los materiales con mayor cantidad de semilla, y otro con menos repeticiones, con los materiales de menor cantidad de semilla. Se contaba con semilla suficiente para realizar dos repeticiones de 134 familias F3:F4 (llamado ensayo 1) y 4 repeticiones de 142 familias F3:F4 (denominado ensayo 2).

	Ambiente con estrés	Ambiente sin estrés
Dos repeticiones	Ensayo 1a	Ensayo 1b
Cuatro repeticiones	Ensayo 2a	Ensayo 2b

Tabla 3: Denominación de los ensayos a campo y número de repeticiones.

En V5 se realizó una aplicación homogénea con fumigador terrestre de Clorpirifos a dosis de marbete para el control de Gusano Cogollero, *Spodoptera frugiperda*. El control de malezas se realizó utilizando Atrazina y Acetoclor a dosis recomendada en el marbete de cada producto en preemergencia y durante el cultivo se realizó de forma manual extrayendo las malezas con azada. Se realizaron dos limpiezas durante el ciclo del cultivo hasta que se cerró el surco. Luego se mantuvieron únicamente los caminos.

En R1 se lograron dos ambientes bien contrastantes, identificados con las letras a (con estrés) y b (sin estrés), provocando un estrés artificial durante el período crítico de la planta. Para ello se produjo una defoliación manual (Martínez *et al.*, 2014). Cuando apareció el primordio de la espiga se quitaron todas las hojas por encima a excepción de la inmediata superior a la espiga, parte del tallo y la futura panoja. Se dejó una planta sin desfoliar cada tres plantas desfoliadas, para no comprometer el volumen de polen del ensayo, y por lo tanto la granazón (Foto 1 y 2 en Anexo III). Esta metodología de defoliación ha sido ampliamente utilizada para reducir la intercepción de radiación durante el periodo crítico del cultivo, afectando la tasa de crecimiento y por consiguiente la fijación de granos (Battaglia, 2014). Por ser muy fácil su implementación a campo se eligió esa técnica de estrés artificial.

Luego de R6 se evaluaron las siguientes variables: número de plantas por parcela, número de espigas por parcela y rendimiento expresado en toneladas por hectárea. La cosecha se realizó de forma manual una vez que el cultivo tenía menos de 14 % de humedad, separando en bolsas cada familia con su correspondiente identificación y cosechando luego con una trilladora estática experimental. También se tomó el dato de humedad de la muestra con humidímetro para corregir el dato de rendimiento si fuera necesario. A partir del análisis de los datos corregidos de cosecha se seleccionaron las diez peores y las diez mejores líneas casi isogénicas según esta variable.

De forma paralela en los laboratorios de Dow Agrosiences en Indianápolis se realizó la secuenciación del genoma completo de los parentales (línea A HP y línea A HR) y de la línea A convencional con el objetivo de determinar en qué puntos específicos del genoma diferían y concentrarse en ellos para el estudio de las progenies. Se realizó una secuenciación de segunda generación. Se utilizó "Illumina HiSeq2000" a una profundidad promedio de 20x (en promedio cada base fue secuenciada 20 veces). Las lecturas de secuenciación se mapearon con respecto al genoma de la línea de maíz B73 utilizando una herramienta computacional que alinea lecturas de corta secuencia comparada con una secuencia de referencia o genoma (Bioinformatics (2009) 25:1754-60). El sitio de integración del transgen se confirmó utilizando una combinación de información de pares y de regiones flanqueantes conocidas. Los SNPs en genes se identificaron utilizando una herramienta que permite manipular, analizar y visualizar archivos que guardan los alineamientos de secuencia.

En Octubre de 2012 en el invernáculo de la planta experimental de Dow Agrosiences se sembraron en macetas diferentes las 20 líneas seleccionadas. Se sacaron ocho discos de hoja por cada línea, se liofilizaron y se enviaron a Indianápolis para su genotipificado. El mismo fue realizado en los laboratorios de Dow Agrosiences Indianápolis, USA. Se seleccionaron SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) disponibles en el panel de marcadores de la compañía en las zonas polimórficas detectadas entre los parentales en la secuenciación, y se analizaron las líneas con esos marcadores. El objetivo fue encontrar un patrón de ausencia de un fragmento proveniente de la versión de la línea HP en las mejores líneas y presencia en las peores para así determinar el o los fragmentos responsables de la merma de rendimiento. El ADN fue extraído de los discos de hoja utilizando el "96 DNA Plant Kit" (Qiagen, Valencia, California) en la plataforma robótica "AgilentBioCel 1800" usando una versión modificada del protocolo de MagAttract (Bohlet. *al.*, 2010). Se utilizó el espectrofotómetro denominado "Nano Drop 8000" (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para obtener cuantificación de ADN y mediciones a 280nm y 260nm; asegurándose de que todas las muestras tuvieran una lectura aceptable de $A_{260/280}$ (≈ 1.8) para ADN puro y una concentración aceptable de ADN para su uso en el protocolo de Illumina Infinium (entre 200 and 750 ng/ μ l). La preparación de las muestras se realizó en bandejas de 96 celdas y extensiones enzimáticas de base simple para incorporar un nucleótido identificado. Los objetivos genómicos se hibridizaron a Illumina 24-sample silica HD Bead Chips, y la fluorescencia de dos colores se detectó utilizando el sistema "Illumina's iScanImaging". El análisis de alelos se realizó utilizando la versión 2011.1 del Software Illumina's GenomeStudio. Los datos se exportaron en una tabla de formato

muestra por locus. Aquellos gráficos de clúster de locus que no mostraban una definición clara se eliminaron antes de exportarlos, asegurándose datos de marcadores de calidad. Los marcadores en los que no ocurría segregación entre las muestras fueron eliminados de la tabla ya que no serían informativos en comparar el genotipo de la línea A HP con las otras dos líneas de mayor rendimiento (HR y convencional). Los resultados del análisis de marcadores moleculares de las progenies se volcaron en tablas de cromosomas.

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa llamado Infostat (versión año 2014) y el Modelo Estadístico utilizado fue el mismo para los dos ensayos y se describe a continuación:

Rendimiento (Kg/parcela) = media general+ efecto de la línea + efecto del estrés + efecto de la interacción línea por estrés + efecto de los bloques + error experimental

RESULTADOS

Ensayos de Rendimiento y Selección de las mejores y peores líneas:

El análisis estadístico indica que para ambos ensayos que el modelo es significativo. Hay diferencias estadísticas entre los dos ambientes. También se observan diferencias significativas entre las Líneas. Considerando los términos del modelo, la interacción entre NILs y el tipo de ambiente no es significativa por lo que podemos analizar ambos efectos conjuntamente. Considerando el efecto estrés, el rendimiento es significativamente mayor sin estrés que con estrés tomando el promedio para ambos ensayos. Al analizar el efecto de los materiales o NILs, hay diferencias significativas de rendimiento entre los mismos. A partir de los resultados del test de comparación de medias (Anexo I; Tablas 5 y 7) y de los desvíos estándares de cada material (Anexo I; Tablas 8 y 9) se seleccionaron las diez peores y las diez mejores líneas para ser genotipificadas y comparadas entre sí buscando el o los genes causantes de la merma. Los datos de rendimiento de las NILs elegidas se encuentran en el Tabla 10.

Referencia	Material	Ensayo	Rendimiento (Tn/ha)
mejor 1	LAHR/HP.0118.110-12-172-B	1	3.45
mejor 2	LAHR/HP.0118.110-48-667-B	2	6.81
mejor 3	LAHR/HP.0118.110-5-60-B	2	3.57
mejor 4	LAHR/HP.0119.104-13-179-B	2	3.69
mejor 5	LAHR/HP.0119.104-50-720-B	2	3.60
mejor 6	LAHR/HP.0151.142-15-214-B	1	3.39
mejor 7	LAHR/HP.0151.142-27-384-B	2	3.53
mejor 8	LAHR/HP.0151.142-33-462-B	1	3.69
mejor 9	LAHR/HP.0151.142-38-532-B	1	3.35
mejor 10	LAHR/HP.0151.142-50-714-B	1	3.70
peor 1	LAHR/HP.0157.143-6-73-B	1	1.61
peor 2	LAHR/HP.0113.101-19-264-B	2	2.29
peor 3	LAHR/HP.0113.101-7-87-B	2	2.21
peor 4	LAHR/HP.0118.110-34-492-B	2	2.48
peor 5	LAHR/HP.0118.110-43-602-B	2	2.71
peor 6	LAHR/HP.0151.142-12-160-B	1	1.64
peor 7	LAHR/HP.0151.142-6-82-B	1	1.74
peor 8	LAHR/HP.0157.143-20-280-B	1	1.51
peor 9	LAHR/HP.0157.143-28-402-B	2	2.55
peor 10	LAHR/HP.0157.143-47-667-B	2	2.22

Tabla 10: Denominación de las mejores y peores líneas seleccionadas, rendimiento y ensayo en el que participaron.

En el Anexo I se encuentran las tablas con los resultados del test de separaciones de medias para los dos ensayos de comparación de rendimiento de líneas realizados a campo. Las tablas 4 y 5 corresponden al ensayo 1 y las tablas 6 y 7 corresponden al ensayo 2. También se encuentran los gráficos de rendimiento medio de las líneas por ensayo (Gráficos 1 y 2). En el Anexo II se encuentran los análisis estadísticos realizados para ambos ensayos. Las tablas 17 y 18 corresponden al Ensayo 1 y las tablas 19 y 20 corresponden al Ensayo 2. Además, en el Anexo II se encuentra el test de comparación de medias realizado entre las plantas seleccionadas de alto y bajo rendimiento (Tabla 23).

También fue calculado el Coeficiente de Variación de cada ensayo en los ambientes con y sin estrés. (Tabla 11 en el Anexo I)

Secuenciación de Líneas Parentales

Se identificaron 340699 SNPs polimórficos entre la línea A convencional y las versiones HP y HR distribuidos en todos los cromosomas (Tabla 12).

Cromosoma	Convencional vs HP	Convencional vs HR
1	6.397	7.657
2	61.267	61.879
3	2.815	1.192
4	597	1.685
5	429	1.324
6	308	177.125
7	1.295	1.215
8	430	1.110
9	284	910
10	329	12.451

Tabla 12: SNPs heteromórficos entre la línea Convencional y las versiones HR y HP.

Se observó que la versión HP posee numerosos fragmentos heredados del padre donante, muchos de los cuales no se encuentran en la versión HR. Por ejemplo los fragmentos

dispuestos en los cromosomas uno, tres y siete (ver Figuras 5, 7 y 11 en el Anexo I). A su vez, se observó que la versión HR poseía numerosas regiones diferentes tanto a la versión convencional como a la HP como es el caso en los cromosomas cuatro, cinco, seis, ocho, nueve y diez. El alto número de SNPs polimórficos en el cromosoma dos es atribuido al evento TC1507, ya que el mismo se inserta en esa región, a un potencial arrastre por ligamiento. La versión HR tiene un polimorfismo similar en esa región. En el Anexo I se encuentran las Figuras 5 a 14 que grafican el número de SNPs polimórficos encontrados en cada cromosoma al comparar las versiones HP y HR de la línea A con la versión convencional en función de la posición en el cromosoma. La frecuencia de SNPs polimórficos de la versión convencional vs la HP se encuentra a la izquierda y la versión Convencional vs la HR a la derecha. Las regiones graficadas representan segmentos del genoma donante que han sido retenidas durante la introgresión.

Solamente el cinco por ciento de dichos SNPs polimórficos eran genes. El 95% restantes pertenecían a regiones no codificantes del genoma y tenían por lo tanto baja a moderado efecto sobre los genes.

Genotificado de las 20 líneas seleccionadas.

En base a las regiones cromosómicas polimórficas encontradas entre las versiones de la línea A, se seleccionaron SNPs pertenecientes al panel de genotificado de alta densidad de Dow AgroSciences. Esos marcadores presentes en los cromosomas uno, tres y siete, se usaron para genotificar las mejores y peores NILs y tratar de establecer si diferían entre ellas en dichos SNPs. (Tabla 13).

Cromosoma	Número de marcadores	% de cobertura
Uno	28	62,3
Tres	34	54,3
Siete	17	59,3

Tabla 13: Estadísticas de marcadores polimórficos entre los parentales.

Los resultados pueden observarse en las tablas de cromosomas (Tablas 14 a 16) que muestran el genotipo de la versión convencional comparada con la HP y con las 20 NILS seleccionadas (diez mejores y diez peores para rendimiento).

En la Tabla 15 se observa que la línea convencional y la HP tienen alelos diferentes en varias posiciones del cromosoma tres. Algunas de las mejores y peores difieren de la versión convencional (mejor dos, tres, cuatro, cinco y peor cuatro, cinco y ocho en la región 0 a 1,22 CentiMorgan) pero varias son idénticas. No hay diferencias alélicas entre las diez mejores y las diez peores que pudieran explicar la diferencia de rendimiento entre ellas.

cromosoma	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
posicion	36.39	36.39	36.39	48.51	52	52	52.74	53.34	54.72	71.63	73.15	73.15	75.25	75.25	129.65	131.14	139.69
plana	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HP	A	A	B	A	A	B	B	H	A	B	A	H	A	A	A	A	B
mejor 1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mejor 2	H	A	B	A	A	H	B	B	A	A	A	A	A	B	A	Z	B
mejor 3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mejor 4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
mejor 5	A	A	A	Z	A	A	A	A	A	Z	A	B	A	A	A	A	A
mejor 6	A	A	A	Z	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
mejor 7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
mejor 8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	A	A	A	A	A
mejor 9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
mejor 10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
peor 1	A	Z	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
peor 2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
peor 3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	A	A	A	A	A
peor 4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A
peor 5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
peor 6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	A	A	A	A	A
peor 7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
peor 8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
peor 9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
peor 10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabla 16: Tabla de muestra x locus de la Línea A HP, línea A Convencional y las 20 NILS seleccionadas en las regiones polimórficas detectadas en el cromosoma siete.

Con respecto a la Tabla16 la línea convencional y la HP tienen alelos diferentes en varias posiciones del cromosoma siete. En el caso de las isolíneas, la mayoría difieren de la convencional (posición: 73.15 cM) a excepción de la mejor uno y mejor diez que son idénticas a la Convencional. No hay diferencias alélicas que se repitan comparando las diez mejores vs las diez peores y que pudieran explicar la diferencia de rendimiento entre ellas.

Por otro lado, el análisis de los marcadores reveló que una de las mejores NILs (la mejor dos) era una fuera de tipo ya que en la mayoría de los marcadores se mostraba al estado heterocigota (denominada mejor dos oLAHR/HP.0118.110-48-667-B).

DISCUSIÓN

Las conversiones de la línea A HP y HR se realizaron en el pasado con la asistencia de marcadores moleculares del tipo micro satélites (SSRs). El mejoramiento asistido por marcadores moleculares es de gran utilidad siempre y cuando se utilicen marcadores que tengan la mayor precisión posible o que posean una alta densidad de cobertura del genoma. Por ejemplo los SNPs son los más precisos ya que detectan cambios en un solo nucleótido, inserciones y/o deleciones mientras que los SSRs solo detectan cambios en el largo de las secuencias repetitivas (Miah *e tal.*, 2013). Además, Los SNPs son más abundantes que los SSRs por lo cual pueden etiquetar mayor cantidad de genes y pueden ser mapeados potencialmente en cualquier región del genoma (dentro de un gen, en el espacio entre genes y en regiones no génicas). Los SSRs rara vez se encuentran dentro de genes (Aggarwal y McEwan, 2014. Reporte interno de Dow Agrosiences). Si los marcadores utilizados no tienen alta cobertura puede quedar una proporción variable de genoma del padredonante. Esto fue lo que ocurrió con la selección de las mejores versiones de la línea A HP y HR utilizando marcadores del tipo SSRs. El uso de SNPs hubiera disminuido el porcentaje de germoplasma residual del padre no recurrente en ambas conversiones.

Este trabajo parte de la suposición de que la versión HR y la versión convencional eran genotípicamente muy similares, tal como lo indicaban los datos fenotípicos, como rendimiento a campo y otros parámetros evaluados. Para facilitar la obtención de una nueva versión HP se cruzó la versión HR con la versión HP, asumiendo que la progenie segregante obtenida solo diferiría en pocos genes candidatos responsables de la merma de rendimiento (los mismos que diferenciarían la versión Convencional de la versión HP). De esta manera se tuvo la ventaja de obtener el gen TC1507 homocigota dominante en las progenies facilitando la selección de una nueva versión con el evento. Posteriormente, con la secuenciación se verificó que la versión HR posee segmentos nuevos que no están en ninguna de las otras dos versiones. Se descubrió que en el cromosoma seis había mucho arrastre por ligamiento (genes del donante alrededor del evento NK603) y que en los cromosomas cuatro, cinco, ocho, nueve y diez había numerosos fragmentos provenientes del padre donante de la conversión. A la luz de los resultados de la secuenciación puede determinarse que el cruzamiento inicial más adecuado para este estudio era la versión HP por la versión convencional.

El primer objetivo específico de este trabajo era mapear los fragmentos cromosómicos responsables de la merma de rendimiento en la versión HP de la línea A. Para ello se analizaron las diez mejores y diez peores progenies de la cruce anteriormente mencionada usando los marcadores polimórficos entre la versión convencional y la versión HP. El análisis realizado por este trabajo no permitió encontrar fragmentos candidatos en los que diferían las mejores y las peores para esos marcadores polimórficos y que podrían explicar la disminución de rendimiento de la versión HP. Por lo tanto no se pudo mapear el o los fragmentos responsables de la merma. Esto podría deberse a las siguientes causas:

- 1) La densidad de marcadores usados en las regiones detectadas no fue suficiente para encontrar el o los fragmentos responsables. Para las progenies seleccionadas se corrieron solo los marcadores disponibles en el panel de Dow Agrosiences, no usando la secuenciación para descubrir y aplicar los nuevos SNPs detectados. Es posible que la merma se deba a fragmentos cromosómicos muy pequeños posicionados entre los marcadores, que no quedan expuesto analizando los mismos.
- 2) Se usaron marcadores sólo en las regiones y cromosomas que más polimorfismo presentaban luego de la secuenciación de los parentales pero las diferencias de rendimiento puede haber estos ocasionadas por muchos genes menores en otros cromosomas. Si se compara la versión de la línea A HP vs la Convencional, a excepción del cromosoma seis y diez y del dos (por el evento) todos los demás cromosomas muestran muchas regiones polimórficas entre ambas versiones con baja frecuencia.
- 3) El ensayo a campo no fue lo suficientemente preciso y la selección de las diez mejores y diez peores fue incorrecta. Se analizaron los Coeficientes de Variación de los ensayos de rendimiento y se observó que los CV promedios fueron relativamente altos y esto se debió principalmente al ambiente con estrés. (Tabla 12). El Coeficiente de variación (CV) ha sido usado por muchos años por investigadores para determinar la validez de los ensayos de rendimiento (Bowman y Watson, 1997), ya que estima cuánto de la variabilidad observada en el ensayo se debe al azar. Mantener el error experimental bajo, incrementar la heredabilidad del rendimiento y minimizar el CV son desafíos de cualquier programa que intente seleccionar materiales en condiciones de estrés. (Bänziger *et al.*, 2000). Se pudo observar que en el ensayo con más repeticiones el CV en ambientes de estrés es menor por lo que el número de repeticiones podría ayudar a disminuir el CV.

Se buscaba el efecto de unos pocos genes a partir de datos de rendimiento, un carácter complejo y poligénico. Como mencionan Hoisington y Ribaut (1998) la dificultad de manipular caracteres cuantitativos se debe a su complejidad genética, principalmente al número de genes involucrados en su expresión y a la interacción entre genes (epistasia) y con el ambiente. El o los fragmentos responsables de la merma de rendimiento en la línea A HP sería sólo uno de ellos. Por esta razón, la repetición de ensayo a campo contribuiría a caracterizar de manera correcta los efectos génicos y para evaluar su estabilidad en los distintos ambientes. Se podrían haber evaluado otros caracteres asociados a la merma de rendimiento como número de plantas estériles, o Intervalo floración masculina y femenina, considerando que están determinados por un menor número de genes, y menos influenciados por el ambiente.

- 4) Las progenies utilizadas no eran realmente líneas casi isogénicas, ya que la versión HR contenía fragmentos no presentes en la HP, haciendo que éstos segregaran en la progenie, además del o los fragmento responsable de la merma. Esto pudo haber determinado que las progenies elegidas como mejores o peores no se deban únicamente a la ausencia o presencia de los fragmentos de la versión HP respectivamente, sino también a otros fragmentos heredados de la versión HR.

El segundo objetivo específico de este trabajo era determinar si los fragmentos del donante causantes de la merma de rendimiento habían sido heredados por arrastre de ligamiento al evento transgénico o si se encontraban en otra posición del genoma. Como no fue posible identificar los fragmentos causantes de la merma y su posición en el genoma, no se pudo determinar si la misma se debe a arrastre por ligamiento o a fragmentos heredados en cualquier otra parte del genoma a través del mapeo. Muchos estudios (Stam and Zeven1981; Young and Tanksley1989;Hospital 2001) han demostrado que la mayoría del germoplasma residual del padre no recurrente en una conversión dada está altamente ligada al gen de interés (arrastre por ligamiento) y es atribuible a la baja probabilidad de recombinantes dobles muy cerca del locus objetivo (Peng *et al.*, 2014).En contraste, los resultados de la secuenciación de la línea A en sus tres versiones (Figura 5) indicarían que es altamente probable que la merma de rendimiento no esté causada por genes ligados al evento TC1507ya que el número y distribución de SNPs polimórficos entre la versión HP y la versión HR en el cromosoma dos son similares, siendo la versión HP la que presenta la merma de rendimiento y no la HR. Sin embargo, no es posible descartar que la merma de rendimiento no se deba efectivamente a arrastre por ligamiento. Es posible que en el caso de la versión HR el rendimiento no se vea disminuido comparando con la versión

convencional debido a la presencia de otras regiones que no están presentes en la HP y que estén compensando la merma causada por arrastre por ligamiento. Las regiones en los cromosomas cuatro, cinco, seis, ocho, nueve y diez de la línea A HR anteriormente mencionados podrían explicar esta compensación.

A partir de los resultados no se puede seleccionar una mejor versión sin el o los fragmentos no deseados ya que si bien se obtuvieron líneas HP con rendimiento comparable con la línea convencional, no se encontraron los fragmentos candidatos causantes de la merma.

Algunos pasos a seguir en el futuro para cumplir con los objetivos planteados son:

1. Realizar el cruzamiento de la línea HP por la convencional y endocriarlas hasta obtener verdaderas líneas casi isogénicas (NILs).
2. Usar los resultados de la secuenciación para descubrir, validar y posteriormente aplicar los SNPs polimórficos detectados.
3. Realizar ensayos a campo con muchas repeticiones con el fin de minimizar el error experimental. Medir caracteres menos cuantitativos como número de plantas estériles, Intervalo floración masculina y femenina, etc.

CONCLUSIONES

A través del análisis de las secuencias de las versiones Convencional, HP y HR de la línea A, se observó que ambas versiones transgénicas diferían en varias posiciones del genoma comparadas con la convencional, y entre ellas. Los marcadores SSRs usados en el pasado para las conversiones no fueron exitosos en recuperar el genoma del padre recurrente.

La localización del fragmento responsable de la merma en la versión HP usando progenies derivados de la cruce HR x HP no fue exitosa. La existencia de múltiples fragmentos segregantes por la causa mencionada en el párrafo anterior, el uso de SNPs con cobertura insuficiente, y las dificultades de realizar ensayos para medir caracteres poligénicos en ambientes de estrés podrían explicar ese resultado.

Al no haberse identificado los fragmentos y su posición, tampoco puede concluirse si estos fueron heredados por arrastre por ligamiento. Sin embargo, las secuencias de las versiones HP y HR en el cromosoma dos alrededor del evento TC1507 son muy similares, indicando que hay altas probabilidades de que los fragmentos se encuentren en otra posición del genoma.

Se seleccionaron versiones de la línea A HP mejoradas, pero sin la posibilidad de asegurar que los fragmentos responsables de la merma estén ausentes en los mismos.

Se identificaron posibilidades de mejora para probar la hipótesis planteada y cumplir con los objetivos del trabajo en el futuro.

FUENTES Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggarwal R., McEwan R., 2014. Development and Application of Molecular Markers in Plant Breeding. COURSE II. Dow Agrosiences internal report.
2. Aggarwal R., Ochsenfeld C., Whitted E., Aus R., Backlund JE and Bing J, 2010. An Efficient and Cost Effective Marker-assisted Backcross Breeding Strategy for donor Trait introgression.
3. Bänziger M., Edmeades, D., Beck D., Bellon M., 2000. Breeding for Drought and Nitrogen Stress Tolerance in Maize. From theory to practice. Mexico, D.F.: CIMMYT.
4. Battaglia, Martin Leonardo, "Corn (*Zea mays* L.) Yield response to defoliation at different row widths" (2014). *Theses and Dissertations--Plant and Soil Sciences*. Paper 56. http://uknowledge.uky.edu/pss_etds/56
5. Bohl S., Nagel J., Bertsch C., Goff R., Hamilton J., Backlund JE., 2010. Genomic DNA Extraction from Eight Punch Fresh Corn Leaf Tissue, Eight Punch Dried Corn Leaf Tissue, Eight and Four Punch Fresh Soybean Tissue, Eight and Four Punch Dried Soybean Tissue, Eight Punch Dried Canola, and Corn Seed Embryo Using QiagenMagAttract 96 Plant Core Kit (24) and the Biocel 1800 from Agilent Automated Solutions. Dow Agrosiences SAGE SOP 2006389.
6. Bowman, DT ; Watson, CE, 1997. Measures of validity in cultivar performance trials. *AGRONOMY JOURNAL*. Volume: 89. Issue: 6. Pages: 860-866. Published: NOV-DEC 1997
7. Canu A., Borowicz T., Tanaka W., Hamilton J., Bing J., 2012. Line A HP yield drag analysis and improvement. PART I: parent physiological and molecular screening. Dow Agrosiences internal report.
8. Chapman S.C. and Edmeades G.O., 1999. Selection Improves Drought Tolerance in Tropical Maize Populations: II. Direct and Correlated Responses among Secondary Traits. *Crop Science*. 39:1315-1324.
9. Collar B., Mackill D., 2006. Marker Assisted breeding for rice improvement. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B*.
10. Cosson, P¹ ; Decroocq, V; Revers, F 2014. Development and characterization of 96

- microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core collection. PLANT METHODS. Volume: 10. ArticleNumber: 2. DOI: 10.1186/1746-4811-10-2. Published: JAN 22 2014
11. Frisch M., Bohn Martin, and Melchinger A. E., 1999. Comparison of selection strategies for Marker Assisted Backcrossing of a gene. CropScience, 39; 1295-1301.
 12. Hospital, F. , 2001. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. GENETICS. Volume:158 .Issue: 3. Pages: 1363-1379. Published: JUL 2001
 13. Martínez, R., Estrada, J., Ruíz, R., Santos, A., Rosales, E. y Montes, E. S, 2014. Revista Mexicana de CienciasAgrícolas Vol.5 Núm.6, p. 1015-1027.
 14. Miah, G;Rafii, MY; Ismail, MR; Puteh, AB; Rahim, HA ; Islam, KN ; Latif, MA, 2013. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. Volume: 14. Issue: 1. Pages: 22499-22528. DOI: 10.3390/ijms141122499; Published: NOV 2013.
 15. Pea, G. ,Aung, HH, Frascaroli, E., Landi P., Pe, M. E., 2013. Extensive genomic characterization of a set of near-isogenic lines for heterotic QTL in maize (Zea mays L.) BMC GENOMICS. Volume: 14. ArticleNumber: 61. DOI: 10.1186/1471-2164-14-61 .Published: JAN 29 2013
 16. Peng, T ; Sun, XC ; Mumm, RH, 2014. Optimized breeding strategies for multiple trait integration: I. Minimizing linkage drag in single event introgression. MOLECULAR BREEDING. Volume: 33. Issue: 1. Pages: 89-104. DOI: 10.1007/s11032-013-9936-7. Published: JAN 2014
 17. Ribaut J. M., Hoisington D., June 1998. Marker Assisted Selection: New Tools and Strategies. Trends in plant science. Vol 3, N°6.
 18. Tanksley S. D., Young N.D., Paterson A. H., Bonierbale M.W., March 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. Department of Plant Breeding, Cornell University, Ithaca, NY 14853.
 19. Tanksley S.D., Nelson J.C., 1995. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm

into elite breeding lines. *TheorApplGenet* (1996) 92: 192-203.

20. Zhu Y.L., QL Song, DL Hyten, CP Van Tassell, LK Matukumalli, DR Grimm, SM Hyatt, EW Fickus, ND Young, PB Cregan 2003. Single nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics* 163: 1123-1134.

ANEXO I: Tablas y Figuras de la Sección Resultados

Ambiente	Media Rendimiento (TN/HA)	N	Agrupamiento por letras (LSD Fisher)
Sin estrés	3,49	259	A
Con estrés	1,58	260	B

Tabla 4: Test de separación de Medias del Ensayo comparativo de rendimiento de líneas número uno comparando los dos ambientes: Con y sin estrés. Las Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

DMS=0,11965

Error: 0,4788

GL: 244

Línea	Media de rendimiento (TN/HA)	N	Error estándar	Agrupamiento por letras (LSD Fisher)
LA	4,07	8	0,24	A
LAHR/HP.0151 .142-50-714-B	3,70	4	0,35	A B
LAHR/HP.0151 .142-33-462-B	3,69	4	0,35	A B
LAHR/HP.0118 .110-12-172-B	3,45	4	0,35	A B C
LAHR/HP.0151 .142-15-214-B	3,39	4	0,35	A B C D
LAHR/HP.0151 .142-38-532-B	3,35	4	0,35	A B C D E
LAHR/HP.0119 .104-46-652-B	3,27	3	0,42	A B C D E F
LAHR/HP.0151 .142-19-269-B	3,21	3	0,42	A B C D E F G
LAHR/HP.0113 .101-15-213-B	3,19	4	0,35	B C D E F G
LAHR/HP.0118 .110-6-83-B	3,16	4	0,35	B C D E F G
LAHR/HP.0118 .110-29-403-B	3,15	3	0,42	B C D E F G H

LAHR/HP.0151 .142-39-555-B	3,14	4	0,35	B C D E F G H
LAHR/HP.0119 .104-15-215-B	3,13	4	0,35	B C D E F G H
LAHR	3,09	6	0,3	B C D E F G H
LAHR/HP.0118 .110-31-452-B	3,08	3	0,42	B C D E F G H I
LAHR/HP.0157 .143-25-356-B	3,08	4	0,35	B C D E F G H I
LAHR/HP.0151 .142-41-583-B	3,04	4	0,35	B C D E F G H I
LAHR/HP.0119 .104-45-640-B	3,03	4	0,35	B C D E F G H I
LAHR/HP.0118 .110-19-275-B	3,02	3	0,42	B C D E F G H I J
LAHR/HP.0119 .104-39-557-B	3,00	4	0,35	B C D E F G H I J
LAHR/HP.0157 .143-3-35-B	2,99	4	0,35	B C D E F G H I J
LAHR/HP.0113 .101-23-328-B	2,98	3	0,42	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0119 .104-33-467-B	2,97	4	0,35	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0157 .143-16-218-B	2,97	4	0,35	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0151 .142-31-445-B	2,96	4	0,35	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0118 .110-36-513-B	2,96	4	0,35	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0118 .110-44-623-B	2,95	4	0,35	B C D E F G H I J K
LAHR/HP.0118 .110-11-151-B	2,95	3	0,42	B C D E F G H I J K L
LAHR/HP.0157 .143-44-627-B	2,94	4	0,35	B C D E F G H I J K L
LAHR/HP.0119 .104-35-495-B	2,90	4	0,35	B C D E F G H I J K L
LAHR/HP.0118 .110-9-123-B	2,90	3	0,42	B C D E F G H I J K L M
LAHR/HP.0157 .143-26-367-B	2,90	4	0,35	B C D E F G H I J K L M
LAHR/HP.0119 .104-10-145-B	2,87	4	0,35	B C D E F G H I J K L M
LAHR/HP.0118 .110-30-425-B	2,81	4	0,35	B C D E F G H I J K L M
LAHR/HP.0113 .101-14-196-B	2,80	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0113 .101-8-111-B	2,78	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0118 .110-26-368-B	2,78	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0119 .104-26-369-B	2,77	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0113 .101-37-527-B	2,77	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N

LAHR/HP.0118 .110-1-11-B	2,76	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0151 .142-46-643-B	2,76	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N
LAHP	2,75	7	0,26	B C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0151 .142-11-146-B	2,75	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0113 .101-6-77-B	2,75	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0113 .101-9-126-B	2,74	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0118 .110-21-293-B	2,73	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0119 .104-27-377-B	2,73	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0119 .104-38-538-B	2,73	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0119 .104-41-585-B	2,73	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-3-37-B	2,70	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-2-26-B	2,69	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-29-414-B	2,68	3	0,42	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-35-500-B	2,68	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0151 .142-32-458-B	2,67	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0113 .101-17-235-B	2,67	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-14-185-B	2,62	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-33-463-B	2,61	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-32-460-B	2,60	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0151 .142-49-693-B	2,59	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-15-200-B	2,57	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0118 .110-46-639-B	2,57	4	0,35	B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-1-12-B	2,56	3	0,42	R B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-42-590-B	2,56	4	0,35	R B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0118 .110-45-630-B	2,55	3	0,42	R B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-22-314-B	2,55	4	0,35	R B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-2-22-B	2,55	2	0,49	R B C D E F G H I J K L M N O P Q
LAHR/HP.0151 .142-40-566-B	2,52	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R

LAHR/HP.0157 .143-32-456-B	2,50	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-16-221-B	2,50	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-17-230-B	2,50	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-18-247-B	2,49	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-25-350-B	2,49	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-23-331-B	2,48	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-42-594-B	2,47	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-2-21-B	2,47	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-7-98-B	2,46	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-11-145-B	2,46	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-37-525-B	2,46	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-13-184-B	2,45	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-49-693-B	2,45	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-1-6-B	2,45	4	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-10-141-B	2,44	2	0,35	C D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-25-355-B	2,44	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-27-372-B	2,43	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-7-100-B	2,42	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-13-186-B	2,40	3	0,42	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-30-423-B	2,40	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-24-341-B	2,40	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-10-141-B	2,39	3	0,42	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-31-433-B	2,39	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-4-42-B	2,36	3	0,42	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-30-424-B	2,36	4	0,35	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-22-313-B	2,36	3	0,42	D E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-6-81-B	2,35	4	0,35	E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-40-565-B	2,33	4	0,35	E F G H I J K L M N O P Q R

LAHR/HP.0118 .110-27-381-B	2,32	3	0,42	E F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-34-473-B	2,31	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-24-341-B	2,30	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-38-543-B	2,29	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-23-320-B	2,29	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-13-178-B	2,28	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-26-370-B	2,27	3	0,42	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-24-336-B	2,27	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-50-715-B	2,27	3	0,42	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-36-507-B	2,24	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-12-165-B	2,23	3	0,42	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-11-155-B	2,20	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-21-298-B	2,19	4	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-1-5-B	2,18	3	0,42	F G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-5-66-B	2,17	4	0,35	G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-16-221-B	2,15	3	0,42	G H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-21-295-B	2,11	4	0,35	H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-25-344-B	2,11	4	0,35	H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-46-649-B	2,10	3	0,42	H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-2-16-B	2,08	4	0,35	H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-17-246-B	2,05	3	0,42	H I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-18-258-B	2,01	4	0,35	I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-28-399-B	2,00	4	0,35	I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-34-489-B	1,97	3	0,42	I J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-22-313-B	1,96	3	0,42	J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-9-124-B	1,95	4	0,32	J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0118 .110-34-482-B	1,95	3	0,42	J K L M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-39-539-B	1,95	4	0,35	K L M N O P Q R

LAHR/HP.0151 .142-35-490-B	1,95	4	0,35	K L M N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-45-633-B	1,94	4	0,35	K L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-45-643-B	1,92	4	0,35	L M N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-47-673-B	1,92	4	0,35	L M N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-18-249-B	1,90	4	0,35	M N O P Q R
LAHR/HP.0113 .101-20-281-B	1,80	4	0,35	N O P Q R
LAHR/HP.0119 .104-42-602-B	1,77	4	0,35	N O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-6-82-B	1,74	3	0,42	N O P Q R
LAHR/HP.0157 .143-31-440-B	1,74	4	0,35	O P Q R
LAHR/HP.0151 .142-48-682-B	1,70	4	0,35	P Q R
LAHR/HP.0151 .142-12-160-B	1,64	4	0,35	Q R
LAHR/HP.0157 .143-6-73-B	1,61	4	0,35	R
LAHR/HP.0157 .143-8-103-B	1,53	3	0,42	R
LAHR/HP.0157 .143-20-280-B	1,51	3	0,42	R

Tabla 5: Test de separación de medias del Ensayo comparativo de rendimiento de líneas número 1 comparando los distintos materiales (NILs). Las Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

DMS=0.99776

Error: 0.4788

Grados de libertad: 244

Ambiente	Media rendimiento (TN/HA)	N	Agrupamiento por letras (LSD Fisher)
Sin estrés	4,08	299	A
Con estrés	2,09	294	B

Tabla 6: Test de separación de Medias del Ensayo comparativo de rendimiento de líneas número 2 comparando los dos ambientes: Con y sin estrés. Las Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

DMS=0.09504

Error: 0.3467

Grados de libertad: 445

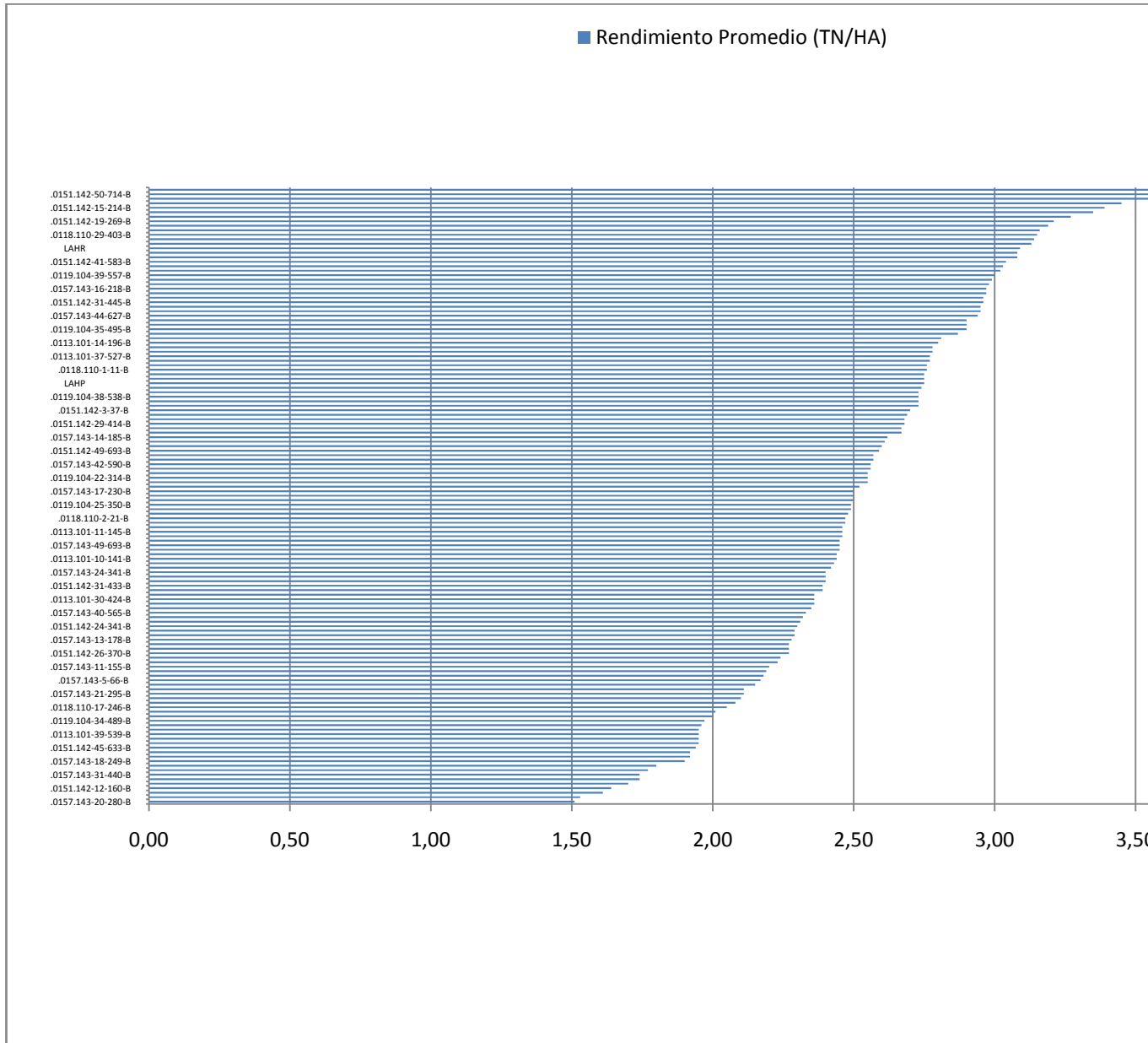


Gráfico 1: Rendimiento Promedio de las Líneas evaluadas en el ensayo 1 (a y b).

Línea	Promedio rendimiento (TN/HA)	n	Error estándar	Agrupamiento por letras (LSD Fisher)
LAHR/HP.011 8.110-48-667- B	6,81	7	0,22	A
LA	3,90	16	0,15	B

LAHR/HP.011 9.104-13-179- B	3,69	8	0,21	B C
LAHR	3,62	8	0,21	B C D
LAHR/HP.011 9.104-50-720- B	3,60	8	0,21	B C D E
LAHR/HP.011 8.110-5-60-B	3,57	8	0,21	B C D E F
LAHR/HP.015 1.142-27-384- B	3,53	8	0,21	B C D E F G
LAHR/HP.0118 .110-41-579-B	3,51	8	0,21	B C D E F G H
LAHR/HP.0119 .104-14-195-B	3,46	8	0,21	B C D E F G H I
LAHR/HP.0113 .101-28-390-B	3,43	7	0,22	B C D E F G H I J
LAHR/HP.0151 .142-22-311-B	3,40	8	0,21	C D E F G H I J K
LAHP	3,39	16	0,15	C D E F G H I J K
LAHR/HP.0151 .142-14-197-B	3,38	8	0,21	C D E F G H I J K
LAHR/HP.0157 .143-19-271-B	3,36	8	0,21	C D E F G H I J K L
LAHR/HP.0151 .142-13-176-B	3,31	8	0,21	C D E F G H I J K L M
LAHR/HP.0151 .142-8-106-B	3,30	7	0,22	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0119 .104-48-692-B	3,28	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0119 .104-23-330-B	3,27	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0113 .101-35-489-B	3,26	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0151 .142-1-1-B	3,26	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0118 .110-42-596-B	3,26	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0119 .104-9-130-B	3,25	8	0,21	C D E F G H I J K L M N
LAHR/HP.0119 .104-40-568-B	3,23	8	0,21	C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0157 .143-4-48-B	3,20	8	0,21	C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0118 .110-37-534-B	3,19	7	0,22	P C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-8-111-B	3,18	8	0,21	P C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0151 .142-7-95-B	3,16	7	0,22	P Q C D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0151 .142-37-520-B	3,15	8	0,21	P Q C D E F G H I J K L M N O

LAHR/HP.0113 .101-32-453-B	3,12	8	0,21	P C D E F G H I J K L M N O Q
LAHR/HP.0119 .104-30-432-B	3,10	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0118 .110-3-31-B	3,09	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-11-157-B	3,09	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-44-636-B	3,09	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-31-441-B	3,09	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-20-279-B	3,08	7	0,22	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-4-55-B	3,08	8	0,21	P Q R D E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0151 .142-28-398-B	3,04	8	0,21	P Q R E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-46-661-B	3,03	8	0,21	P Q R E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0119 .104-3-39-B	3,02	8	0,21	P Q R E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0151 .142-5-70-B	3,01	7	0,22	P Q R E F G H I J K L M N O
LAHR/HP.0151 .142-23-326-B	3,00	8	0,21	Q R F G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-29-404-B	2,99	8	0,21	Q R G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-17-244-B	2,97	8	0,21	Q R G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-36-506-B	2,96	8	0,21	Q R G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0157 .143-12-161-B	2,96	8	0,21	Q R G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-16-223-B	2,95	7	0,22	Q R G H I J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-21-300-B	2,95	8	0,21	Q R H I J K L M N O P
LAHR/HP.0118 .110-49-681-B	2,94	8	0,21	Q R H I J K L M N O P
LAHR/HP.0118 .110-40-563-B	2,94	8	0,21	Q R H I J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-33-464-B	2,93	8	0,21	Q R I J K L M N O P
LAHR/HP.0118 .110-10-142-B	2,90	8	0,21	Q R I J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-24-338-B	2,88	8	0,21	Q R J K L M N O P
LAHR/HP.0157 .143-35-492-B	2,87	8	0,21	Q R J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-26-365-B	2,87	8	0,21	Q R J K L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-2-18-B	2,86	8	0,21	Q R S J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-43-609-B	2,85	8	0,21	Q R S J K L M N O P

LAHR/HP.0151 .142-34-478-B	2,84	7	0,22	Q R S	J K L M N O P
LAHR/HP.0118 .110-39-556-B	2,83	7	0,22	Q R S	J K L M N O P
LAHR/HP.0151 .142-25-347-B	2,80	7	0,22	Q R S T	K L M N O P
LAHR/HP.0118 .110-33-469-B	2,79	8	0,21	Q R S T	L M N O P
LAHR/HP.0113 .101-42-557-B	2,78	8	0,21	Q R S T	L M N O P
LAHR/HP.0157 .143-27-387-B	2,76	7	0,22	Q R S T	L M N O P
LAHR/HP.0157 .143-43-610-B	2,76	8	0,21	R S T	M N O P Q
LAHR/HP.0157 .143-48-681-B	2,73	8	0,21	R S T U	N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-37-530-B	2,72	8	0,21	R S T U	N O P Q
LAHR/HP.011 8.110-43-602- B	2,71	8	0,21	R S T U	N O P Q
LAHR/HP.0119 .104-49-707-B	2,67	8	0,21	R S T U	O P Q
LAHR/HP.0151 .142-20-279-B	2,60	8	0,21	R S T U	P Q
LAHR/HP.015 7.143-28-402- B	2,55	7	0,22	R S T U	Q
LAHR/HP.011 8.110-34-492- B	2,48	6	0,24	S T U	R
LAHR/HP.011 3.101-19-264- B	2,29	8	0,21	S T U	
LAHR/HP.015 7.143-47-667- B	2,22	8	0,21	T U	
LAHR/HP.011 3.101-7-87-B	2,21	8	0,21	T U	
LAHR/HP.0113 .101-31-434-B	2,15	8	0,21	U	

Tabla 7: Test de separación de medias del Ensayo comparativo de rendimiento de líneas número 2 comparando los distintos materiales (NILs). Las Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

MDS=0.58056

Error: 0.3460

GL: 442

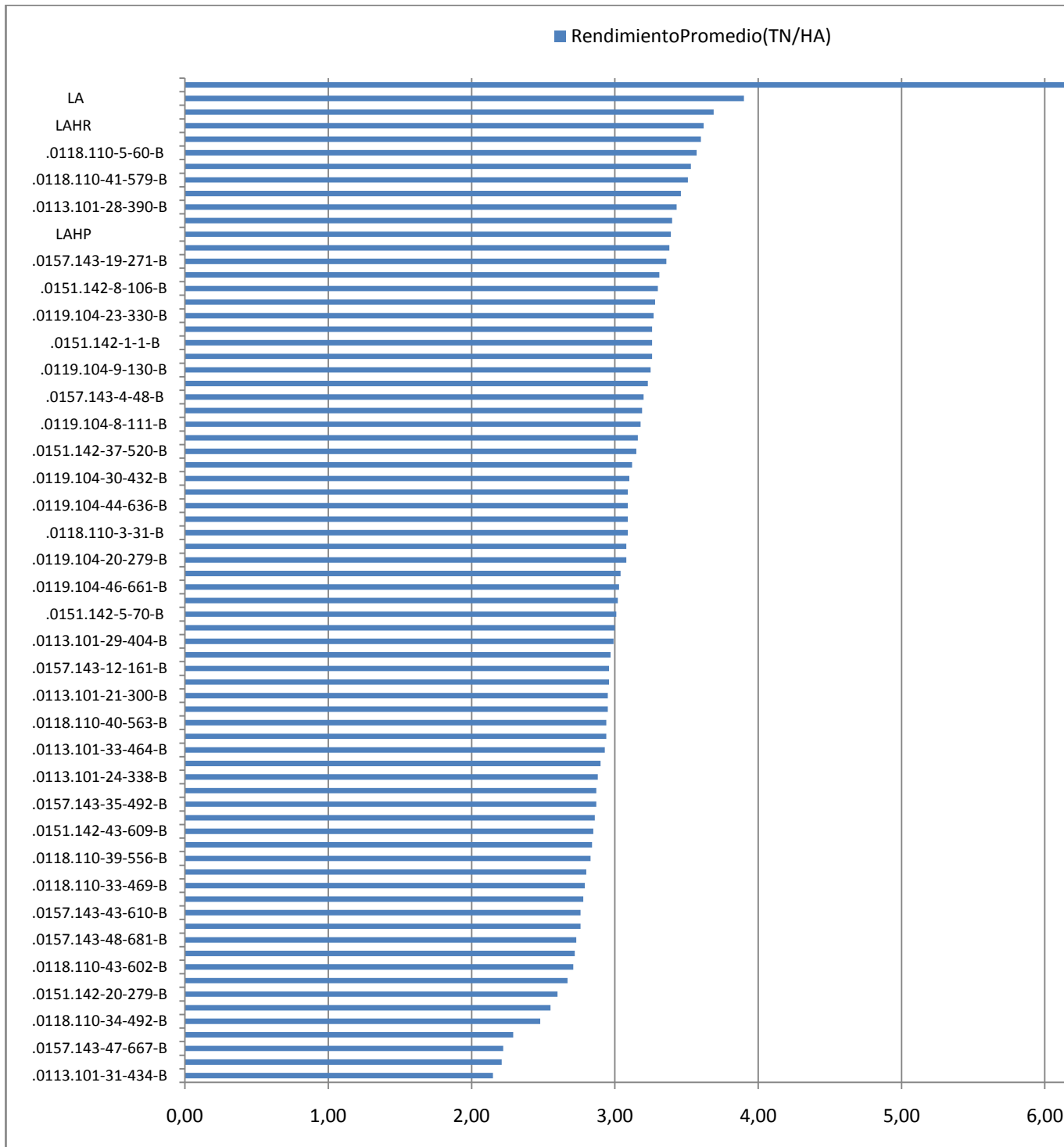


Gráfico 2: Rendimiento Promedio de las líneas evaluadas en el ensayo 2 (a y b)

Ensayo	CV con estrés	CV sin estrés	CV promedio
1	36,81	21,59	26,99

2	23,56	16,12	18,9
---	-------	-------	------

Tabla 11: Coeficiente de Variación (CV) promedio de cada ensayo y separado por ambientes.

Línea	Desvío estándar
LAHR/HP.0118.110-17-246-B	0,0370
LAHR/HP.0157.143-46-649-B	0,3267
LAHR/HP.0157.143-6-73-B	0,3841
LAHR/HP.0157.143-32-456-B	0,4686
LAHR/HP.0118.110-34-482-B	0,4699
LAHR/HP.0113.101-39-539-B	0,4798
LAHR	0,5650
LAHR/HP.113.11-1-5-B	0,6559
LAHR/HP.0157.143-26-367-B	0,6613
LAHR/HP.0151.142-12-160-B	0,6673
LAHR/HP.0113.101-10-141-B	0,6748
LAHR/HP.0113.101-8-111-B	0,6748
LAHR/HP.0157.143-14-185-B	0,6973
LAHR/HP.0113.101-12-165-B	0,7053
LAHR/HP.0113.101-17-235-B	0,7304
LAHR/HP.0113.101-11-145-B	0,7354
LAHR/HP.0119.104-25-350-B	0,7486
LAHR/HP.0118.110-4-42-B	0,7578
LAHR/HP.0118.110-25-355-B	0,7674
LAHR/HP.0113.101-18-258-B	0,7751
LAHR/HP.0118.110-45-630-B	0,7809
LAHR/HP.0113.101-22-313-B	0,8050
LAHR/HP.0119.104-47-673-B	0,8121
LAHR/HP.0157.143-13-178-B	0,8163
LAHR/HP.0113.101-23-328-B	0,8281
LAHR/HP.0118.110-12-172-B	0,8387
LAHR/HP.0118.110-21-293-B	0,8424
LAHR/HP.0118.110-11-151-B	0,8495
LAHR/HP.0151.142-45-633-B	0,8822
LAHR/HP.0113.101-20-281-B	0,8869
LAHR/HP.0151.142-3-37-B	0,9013
LAHR/HP.0151.142-31-445-B	0,9025
LAHR/HP.0119.104-41-585-B	0,9286
LAHR/HP.0151.142-48-682-B	0,9408
LAHR/HP.0119.104-45-640-B	0,9622
LAHR/HP.0157.143-16-218-B	0,9659
LAHR/HP.0157.143-20-280-B	0,9733
LAHR/HP.0118.110-26-368-B	0,9874

LAHR/HP.0119.104-36-507-B	0,9976
LAHR/HP.0151.142-50-714-B	1,0008
LAHR/HP.0119.104-10-145-B	1,0056
LAHR/HP.0113.101-16-221-B	1,0164
LAHR/HP.0113.101-6-77-B	1,0298
LAHR/HP.0151.142-26-370-B	1,0383
LAHR/HP.0119.104-18-247-B	1,0439
LAHR/HP.0157.143-17-230-B	1,0587
LAHR/HP.0119.104-32-460-B	1,0615
LAHR/HP.0118.110-2-21-B	1,0739
LAHR/HP.0157.143-45-643-B	1,0747
LAHR/HP.0113.101-34-473-B	1,0753
LAHR/HP.0113.101-30-424-B	1,0770
LAHR/HP.0113.101-13-184-B	1,1127
LAHR/HP.0119.104-42-602-B	1,1358
LAHR/HP.0151.142-38-532-B	1,1448
LAHR/HP.0118.110-6-83-B	1,1464
LAHR/HP.0118.110-9-123-B	1,1476
LAHR/HP.0151.142-6-82-B	1,1549
LA	1,1642
LAHR/HP.0119.104-21-298-B	1,1644
LAHR/HP.0157.143-49-693-B	1,1699
LAHR/HP.0157.143-21-295-B	1,1723
LAHP	1,1747
LAHR/HP.0151.142-15-214-B	1,1863
LAHR/HP.0118.110-29-403-B	1,1890
LAHR/HP.0157.143-33-463-B	1,1994
LAHR/HP.0151.142-35-490-B	1,2021
LAHR/HP.0151.142-41-583-B	1,2105
LAHR/HP.0119.104-33-467-B	1,2175
LAHR/HP.0151.142-49-693-B	1,2213
LAHR/HP.0118.110-19-275-B	1,2246
LAHR/HP.0157.143-18-249-B	1,2378
LAHR/HP.0157.143-8-103-B	1,2438
LAHR/HP.0119.104-22-314-B	1,2440
LAHR/HP.0113.101-25-344-B	1,2468
LAHR/HP.0157.143-50-715-B	1,2612
LAHR/HP.0119.104-7-100-B	1,2778
LAHR/HP.0118.110-13-186-B	1,2936
LAHR/HP.0118.110-16-221-B	1,3141
LAHR/HP.0151.142-33-462-B	1,3159
LAHR/HP.0157.143-23-320-B	1,3351
LAHR/HP.0119.104-6-81-B	1,3519
LAHR/HP.0157.143-25-356-B	1,3534
LAHR/HP.0157.143-2-16-B	1,3564

LAHR/HP.0157.143-30-423-B	1,3609
LAHR/HP.0151.142-11-146-B	1,3725
LAHR/HP.0157.143-9-124-B	1,3741
LAHR/HP.0157.143-7-98-B	1,3843
LAHR/HP.0119.104-35-495-B	1,3867
LAHR/HP.0113.101-37-527-B	1,3963
LAHR/HP.0157.143-5-66-B	1,3974
LAHR/HP.0157.143-31-440-B	1,4090
LAHR/HP.0119.104-34-489-B	1,4281
LAHR/HP.0157.143-24-341-B	1,4322
LAHR/HP.0118.110-23-331-B	1,4396
LAHR/HP.0118.110-44-623-B	1,4569
LAHR/HP.0157.143-40-565-B	1,4616
LAHR/HP.0119.104-24-336-B	1,4827
LAHR/HP.0157.143-10-141-B	1,4828
LAHR/HP.0151.142-40-566-B	1,4828
LAHR/HP.0157.143-22-313-B	1,5159
LAHR/HP.0151.142-42-594-B	1,5190
LAHR/HP.0157.143-35-500-B	1,5224
LAHR/HP.0119.104-1-12-B	1,5280
LAHR/HP.0118.110-30-425-B	1,5513
LAHR/HP.0113.101-14-196-B	1,5663
LAHR/HP.0118.110-46-639-B	1,5696
LAHR/HP.0119.104-39-557-B	1,5790
LAHR/HP.0151.142-29-414-B	1,5816
LAHR/HP.0119.104-27-377-B	1,5897
LAHR/HP.0157.143-3-35-B	1,5995
LAHR/HP.0157.143-1-6-B	1,6080
LAHR/HP.0118.110-28-399-B	1,6119
LAHR/HP.0157.143-37-525-B	1,6164
LAHR/HP.0113.101-15-213-B	1,6172
LAHR/HP.0151.142-31-433-B	1,6258
LAHR/HP.0113.101-27-372-B	1,6500
LAHR/HP.0119.104-26-369-B	1,6662
LAHR/HP.0118.110-1-11-B	1,6744
LAHR/HP.0151.142-39-555-B	1,6746
LAHR/HP.0151.142-24-341-B	1,6871
LAHR/HP.0151.142-32-458-B	1,6886
LAHR/HP.0151.142-46-643-B	1,6932
LAHR/HP.0119.104-2-22-B	1,6978
LAHR/HP.0157.143-11-155-B	1,6987
LAHR/HP.0157.143-38-543-B	1,7079
LAHR/HP.0118.110-31-452-B	1,7113
LAHR/HP.0157.143-15-200-B	1,7167
LAHR/HP.0113.101-9-126-B	1,7367

LAHR/HP.0118.110-36-513-B	1,7457
LAHR/HP.0151.142-19-269-B	1,7586
LAHR/HP.0118.110-27-381-B	1,7763
LAHR/HP.0157.143-42-590-B	1,7897
LAHR/HP.0119.104-46-652-B	1,7962
LAHR/HP.0157.143-44-627-B	1,9216
LAHR/HP.0119.104-15-215-B	2,0554
LAHR/HP.0151.142-2-26-B	2,1914
LAHR/HP.0119.104-38-538-B	2,5055

Tabla8: Desvío estándar de cada material testeado en el ensayo uno. Los materiales están ordenados del menor al mayor desvío.

Línea	Desvío estándar
LAHR/HP.0151.142-20-279-B	0,7001
LAHR/HP.0157.143-12-161-B	0,7560
LAHR/HP.0113.101-26-365-B	0,8270
LAHR/HP.0151.142-17-244-B	0,8417
LAHR/HP.0113.101-33-464-B	0,8438
LAHR/HP.0119.104-40-568-B	0,8698
LAHR/HP.0151.142-34-478-B	0,8830
LAHR/HP.0151.142-25-347-B	0,8878
LA	0,8884
LAHR/HP.0113.101-29-404-B	0,8913
LAHR/HP.0151.142-14-197-B	0,9322
LAHR/HP.0119.104-8-111-B	0,9533
LAHR/HP.0157.143-19-271-B	0,9554
LAHR/HP.0118.110-42-596-B	0,9597
LAHR/HP.0119.104-46-661-B	1,0082
LAHR/HP.0151.142-43-609-B	1,0146
LAHR/HP.0118.110-39-556-B	1,0261
LAHR/HP.0113.101-19-264-B	1,0342
LAHR/HP.0113.101-7-87-B	1,0501
LAHR/HP.0118.110-3-31-B	1,0726
LAHR/HP.0151.142-13-176-B	1,0763
LAHR/HP.0119.104-31-441-B	1,0956
LAHR/HP.0119.104-11-157-B	1,0985
LAHR/HP.0113.101-21-300-B	1,0989
LAHR/HP.0157.143-47-667-B	1,1022
LAHR/HP.0118.110-43-602-B	1,1069
LAHR/HP.0157.143-4-48-B	1,1102
LAHR/HP.0151.142-5-70-B	1,1327
LAHR/HP.0157.143-28-402-B	1,1352

LAHR/HP.0119.104-13-179-B	1,1409
LAHR/HP.0151.142-28-398-B	1,1430
LAHR/HP.0119.104-48-692-B	1,1438
LAHR/HP.0157.143-35-492-B	1,1580
LAHR/HP.0151.142-27-384-B	1,1640
LAHR/HP.0118.110-5-60-B	1,1713
LAHR/HP.0151.142-1-1-B	1,1722
LAHR/HP.0113.101-24-338-B	1,2008
LAHR/HP.0119.104-44-636-B	1,2024
LAHR/HP.0118.110-34-492-B	1,2114
LAHR/HP.0119.104-50-720-B	1,2211
LAHR/HP.0113.101-35-489-B	1,2440
LAHR/HP.0119.104-30-432-B	1,2489
LAHR/HP.0119.104-20-279-B	1,2539
LAHR/HP.0118.110-33-469-B	1,2619
LAHR/HP.0118.110-41-579-B	1,2682
LAHR/HP.0119.104-9-130-B	1,2702
LAHR/HP.0118.110-49-681-B	1,2735
LAHR/HP.0119.104-37-530-B	1,2780
LAHR/HP.0113.101-32-453-B	1,2877
LAHR/HP.0151.142-7-95-B	1,2882
LAHR/HP.0118.110-10-142-B	1,2884
LAHR/HP.0151.142-8-106-B	1,2981
LAHP	1,3002
LAHR/HP.0119.104-4-55-B	1,3422
LAHR/HP.0157.143-27-387-B	1,3499
LAHR/HP.0151.142-16-223-B	1,3509
LAHR/HP.0157.143-48-681-B	1,3526
LAHR/HP.0118.110-37-534-B	1,3598
LAHR/HP.0151.142-37-520-B	1,3602
LAHR/HP.0118.110-40-563-B	1,3636
LAHR/HP.0119.104-49-707-B	1,3726
LAHR/HP.0113.101-42-557-B	1,3914
LAHR/HP.0113.101-36-506-B	1,4055
LAHR/HP.0157.143-43-610-B	1,4056
LAHR/HP.0119.104-14-195-B	1,4343
LAHR/HP.0119.104-3-39-B	1,4614
LAHR/HP.0151.142-23-326-B	1,4742
LAHR/HP.0151.142-22-311-B	1,5218
LAHR/HP.0113.101-28-390-B	1,5351
LAHR/HP.0113.101-2-18-B	1,5923
LAHR/HP.0113.101-31-434-B	1,6463
LAHR	1,7930
LAHR/HP.0119.104-23-330-B	1,8115
LAHR/HP.0118.110-48-667-B	2,1484

Tabla9: Desvío estándar de cada material testeado en el ensayo dos. Los materiales están ordenados del menor al mayor desvío.

En todas las tablas se encuentran resaltadas en negritas las líneas seleccionadas.

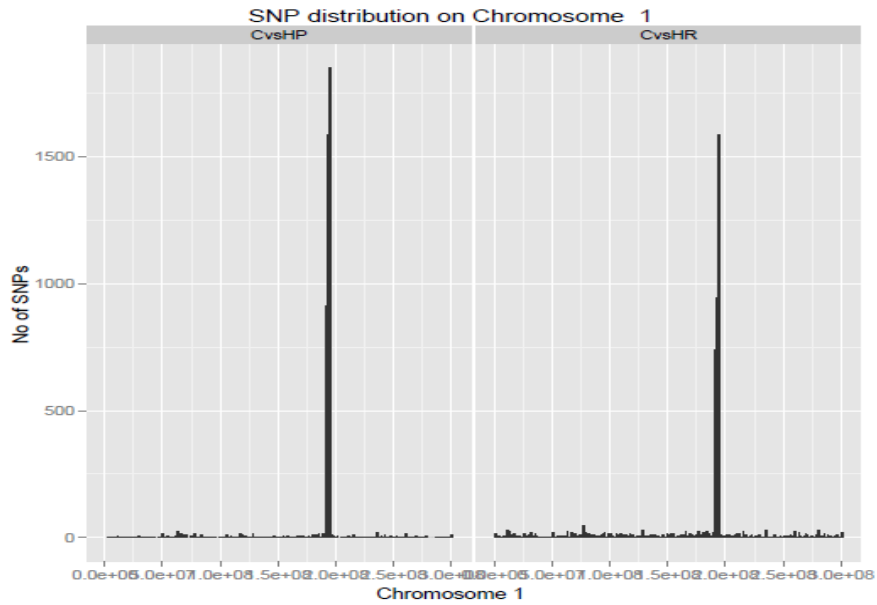


Figura 5: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma uno (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

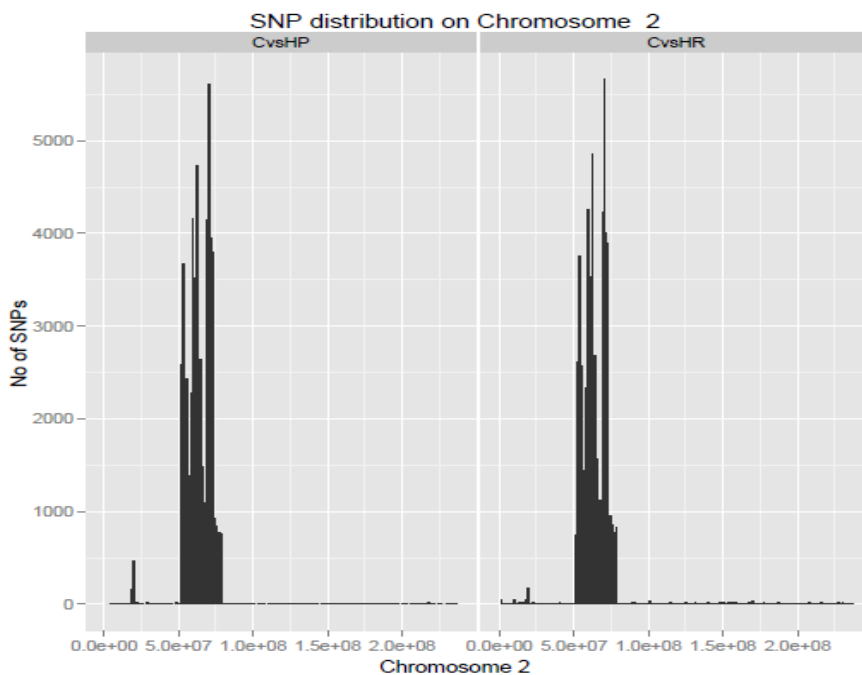


Figura 6: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma dos (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

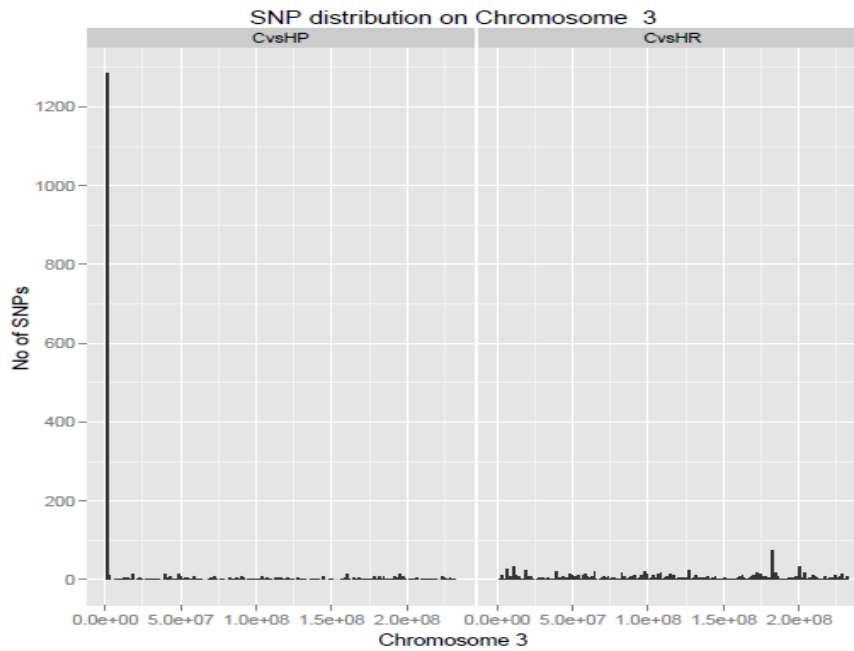


Figura 7: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma tres (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

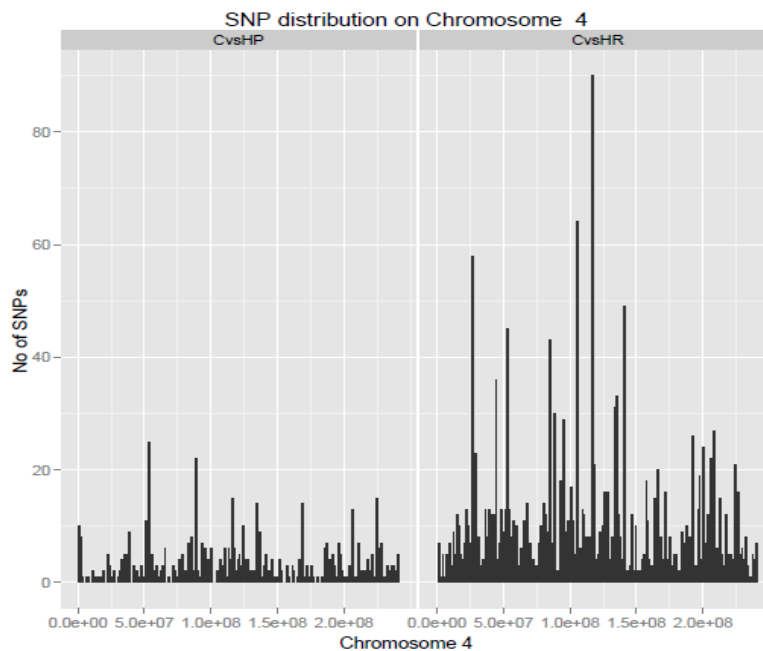


Figura 8: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma cuatro (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

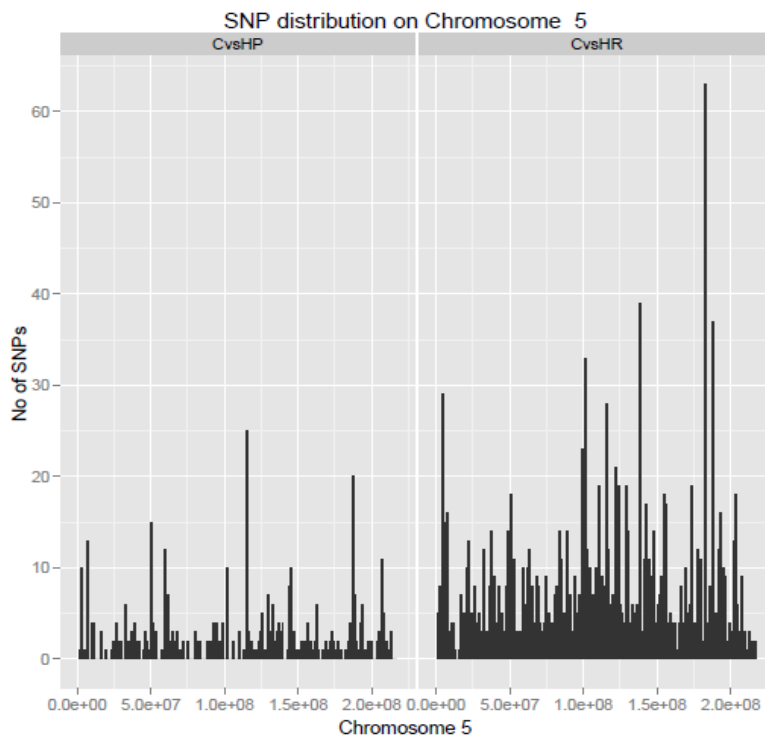


Figura 9: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma cinco (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

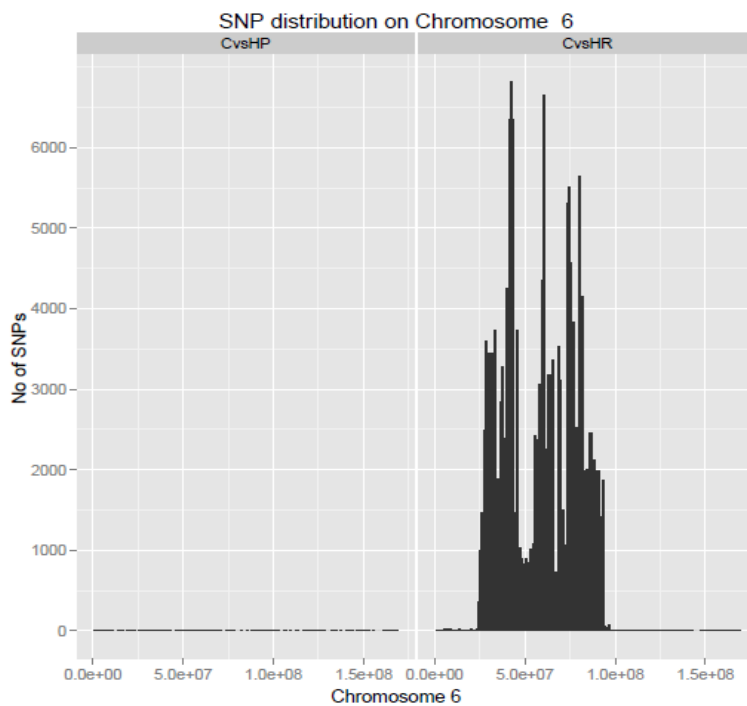


Figura 10: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma seis (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

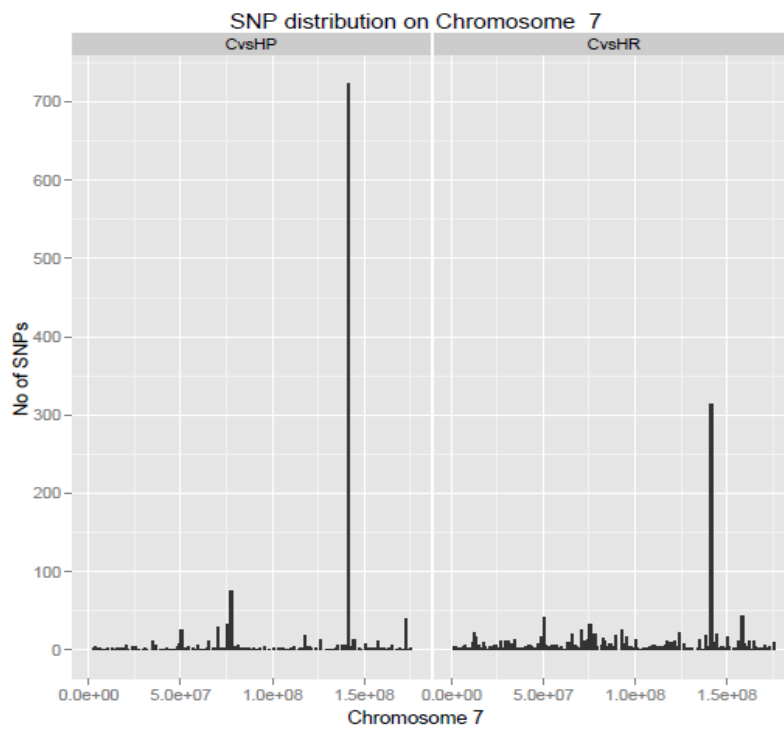


Figura 11: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma siete (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

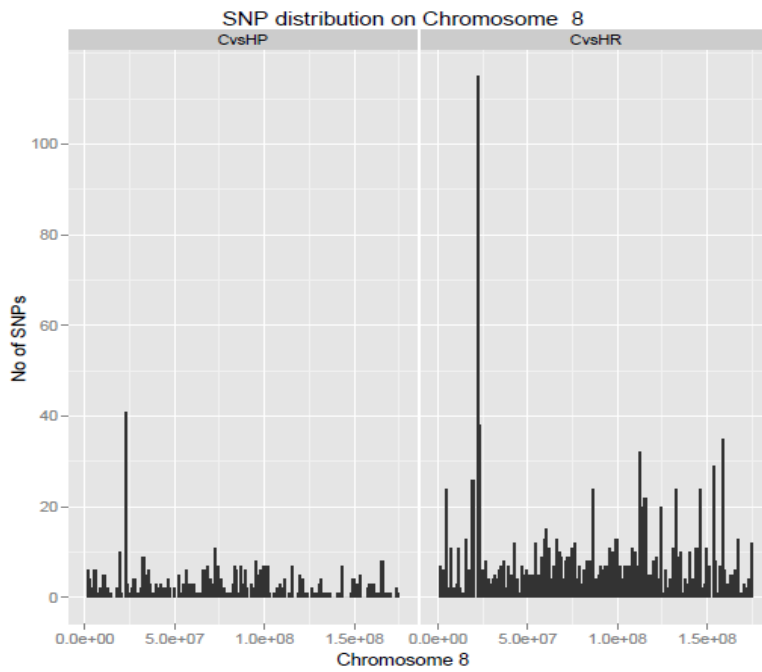


Figura 12: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma ocho (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

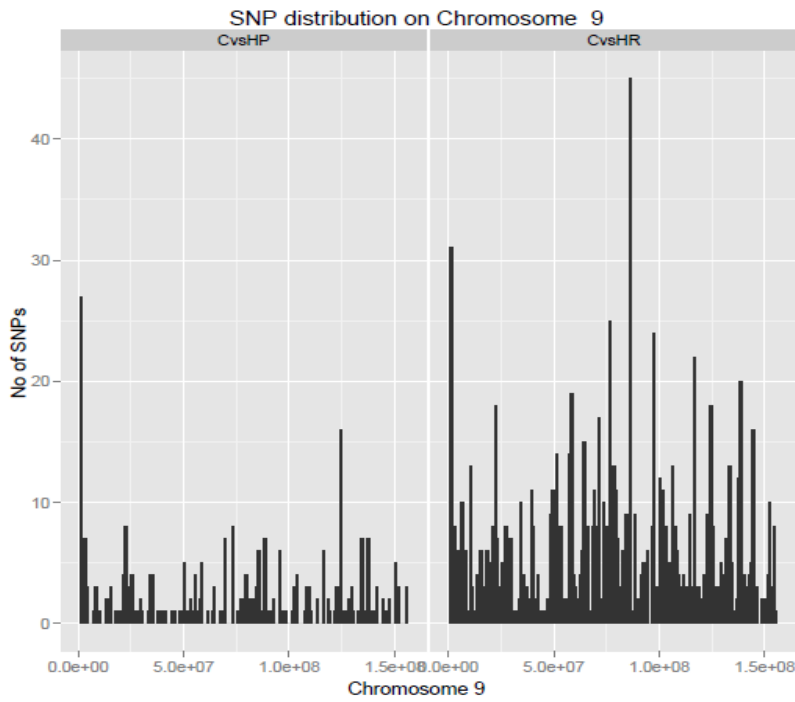


Figura 13: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma nueve (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

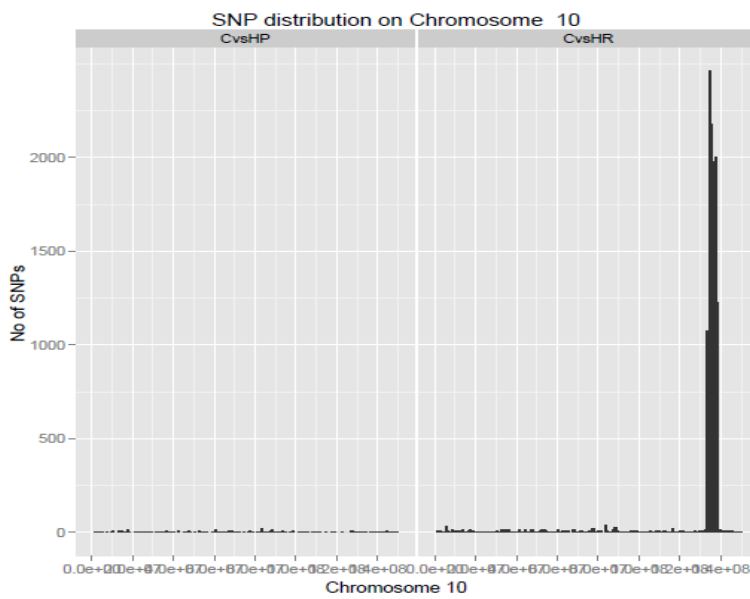


Figura 14: Ubicación y Frecuencia de SNPs en el cromosoma diez (versión HP (izquierda) y HR (derecha) vs la versión convencional)

ANEXO II: Análisis Estadísticos

*Ensayo Comparativo de Rendimiento de Líneas1a y 1b:

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Rend(Tn/ha)	519	0.85	0.68	26.99

Tabla 17: Análisis del ensayo uno.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Model	647.97	274	2.36	4.94	<0.0001
Analytical Rep#	2.11	1	2.11	4.41	0.0368
Estrés	467.08	1	467.08	975.59	<0.0001
Name	120.02	136	0.88	1.84	<0.0001
Estrés*Name	58.76	136	0.43	0.90	0.7451
Error	116.82	244	0.48		
Total	764.79	518			

Tabla 18: Análisis de la variancia del ensayo uno (Suma de Cuadrados).

*Ensayo Comparativo de Rendimiento de Líneas2a y 2b:

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Rend(Tn/ha)	593	0.84	0.78	18.90

Tabla 19: Análisis del ensayo dos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Model	785.54	150	5.24	15.13	<0.0001
Estrés	580.17	1	580.17	1676.56	<0.0001
Analytical Rep#	0.86	3	0.29	0.82	0.4813
Name	178.89	73	2.45	7.08	<0.0001
Estrés*Name	25.62	73	0.35	1.01	0.4512
Error	152.95	442	0.35		
Total	938.49	592			

Tabla 20: Análisis de la variancia del ensayo dos (Suma de Cuadrados).

***Test de Comparación de medias entre las líneas seleccionadas por alto y bajo rendimiento:**

Variable	N	R ²	AdjR ²	CV
Rend(Tn/ha)	118	0,51	0,39	41,18

Tabla 21: Análisis de la variancia.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	158.99	22	7.23	4,41	<0.0001
Línea	156.40	19	8.23	5,02	<0.0001
Rep	2,59	3	0.86	0.53	0.6651
Error	155,72	95	1,64		
Total	314,71	117			

Tabla 22: Cuadro de Análisis de la variancia (SC tipo I).

Línea	Rend (Tn/ha)	Repet.	E.E.	
LAHR/HP.0157.143-6-73-B	1,61	4	0,64	A
LAHR/HP.0151.142-12-160-B	1,64	4	0,64	A
LAHR/HP.0157.143-20-280-B	1,51	3	0,74	A B
LAHR/HP.0151.142-6-82-B	1,74	3	0,74	A B
LAHR/HP.0113.101-7-87-B	2,21	8	0,46	A B
LAHR/HP.0157.143-47-667-B	2,22	8	0,46	A B
LAHR/HP.0113.101-19-264-B	2,29	8	0,46	A B
LAHR/HP.0118.110-34-492-B	2,48	6	0,53	A B
LAHR/HP.0157.143-28-402-B	2,55	7	0,49	A B
LAHR/HP.0118.110-43-602-B	2,71	8	0,46	A B
LAHR/HP.0151.142-38-532-B	3,35	4	0,64	A B
LAHR/HP.0151.142-15-214-B	3,39	4	0,64	A B
LAHR/HP.0118.110-12-172-B	3,45	4	0,64	B
LAHR/HP.0151.142-27-384-B	3,53	8	0,46	B
LAHR/HP.0118.110-5-60-B	3,57	8	0,46	B
LAHR/HP.0119.104-50-720-B	3,60	8	0,46	B
LAHR/HP.0119.104-13-179-B	3,69	8	0,46	B
LAHR/HP.0151.142-33-462-B	3,69	4	0,64	B
LAHR/HP.0151.142-50-714-B	3,70	4	0,64	B
LAHR/HP.0118.110-48-667-B	6,81	7	0,49	C

Tabla 23: Test de comparación de medias de las Líneas seleccionadas por alto y bajo rendimiento. Test: LSD Fisher. Alfa=0,05 DMS= 1,58101

ANEXO III: Fotografías



Foto 1: Vista de las plantas de Maíz luego de haber sido desfoliadas y despanojadas para simular stress. Se observa que se quitaron todas las hojas por encima del primordio de la espiga a excepción de la inmediata superior.



Foto 2: Vista del ensayo al momento de desfoliar. Se observa que se dejó una planta sin desfoliar y despanojar cada 3 plantas.