

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

**BASES DEL CONTROL GENÉTICO DE LA TASA DE SECADO DEL  
GRANO POST MADUREZ FISIOLÓGICA EN LÍNEAS PARENTALES Y  
SUS HÍBRIDOS DERIVADOS EN MAÍZ**

**Ing. Agr. Ignacio San Marco**

**TESIS PARA OPTAR AL EL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL**

**DIRECTOR: Dra. Brenda Gambin**

**CO-DIRECTOR: Dr. Lucas Borrás**

**2017**

**BASES DEL CONTROL GENÉTICO DE LA TASA DE SECADO DEL GRANO  
POST MADUREZ FISIOLÓGICA EN LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDOS  
DERIVADOS EN MAÍZ**

Ignacio San Marco

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Río Cuarto

Esta Tesis está 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 por el Departamento de Investigación Maíz de Nidera S.A., durante el período comprendido entre marzo de 2015 y agosto de 2017, bajo la dirección de la Dra. Brenda Gambin.

---

Ing. Agr. Ignacio San Marco

Maestrando

---

Dra. Brenda Gambin

Directora

---

Dr. Lucas Borrás

Co-director

Defendida: ..... de 20\_\_\_\_\_.

## **AGRADECIMIENTOS**

- *Quiero agradecer a los Dres. Brenda Gambín y Lucas Borrás, excelentes directores, gracias por abrirme las puertas, permitirme formar parte del grupo y por compartir sus conocimientos generosamente conmigo.*
- *A Nidera SA.*
- *A Santiago Alvarez Prado y Edgardo Bresso por colaborar desinteresadamente.*
- *Y muy especialmente quiero agradecer a mis afectos.*

## INDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	16
Material vegetal.....	16
Experimentos a campo.....	16
Mediciones fenotípicas.....	17
Análisis de datos fenotípicos.....	19
Análisis de genotipado.....	21
Análisis de QTL multi-atributo multi-ambiente multi-tipo.....	22
RESULTADOS.....	24
Condiciones climáticas.....	24
Caracterización fenotípica de líneas.....	25
Caracterización fenotípica de híbridos.....	28
Relación fenotípica entre líneas e híbridos.....	30
Análisis de QTLs conjuntos.....	35
Análisis de QTLs individuales.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXO I.....	52

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**BLUP:** “Best Linear Unbiased Predictor”. Mejor predictor lineal insesgado.

**CIM:** “Composite Interval Mapping”. Mapeo por intervalos compuestos.

**cM:** Centimorgan.

**DPV:** Déficit de presión de vapor.

**ET0:** Evapotranspiración potencial.

**kPa:** Kilopascal.

**LOD:** Logaritmo de Odds.

**MAP:** “Monoammonium Phosphate”. Fosfato monoamónico.

**MAS:** “Marker Assited Selection”. Selección asistida por marcadores.

**MIM:** “Multiple Interval Mapping”. Mapeo por intervalos multiples.

**REML:** “Restricted Maximum Likelihood”. Máxima verosimilitud restringida.

**RIL:** “Recombinant Inbred Line”. Línea recombinante.

**SNPs:** “Single Nucleotide Polymorphism”. Polimorfismo de nucleótido simple.

**QTL:** “Quantitative Trait Loci”. Loci de caracteres cuantitativos.

**°Cd:** “Grados centígrados día”.

## RESUMEN

La humedad de grano a cosecha es de vital importancia para la producción de maíz, ya que afecta la calidad de la semilla y los costos de producción. Uno de los principales objetivos del mejoramiento es reducir el contenido de agua del grano a cosecha para disminuir el impacto económico del secado artificial. Además del momento en el que tiene lugar la madurez fisiológica, la tasa de secado después de la misma tiene un alto impacto en la humedad a cosecha. La tasa de secado es de difícil fenotipificación a campo, por lo que asociar el secado con otros caracteres de fácil determinación es de gran utilidad. Asimismo, determinar las bases genéticas (QTL) de estos caracteres es de gran interés para el mejoramiento. Finalmente, evaluar estos caracteres y sus bases genéticas no sólo en líneas sino también en híbridos derivados es relevante para su aprovechamiento en mejora genética. Los objetivos de la presente tesis fueron (i) caracterizar fenotípicamente una población de líneas e híbridos derivados para tasa de secado y diversos caracteres potencialmente asociados con la tasa de secado (tiempo a antesis, stay green, largo y número de chalas), (ii) establecer la correlación entre la tasa de secado en líneas e híbridos, y su relación con los otros caracteres fenotípicos medidos, y (iii) estudiar las bases genéticas (QTLs) de la tasa de secado tanto en líneas como en híbridos.

Para cumplir estos objetivos se sembró una población biparental de líneas recombinantes (RILs,  $n=129$ ) y sus híbridos derivados de la cruce por un tester ( $n=129$ ) en dos ambientes (fechas de siembra temprana y tardía) en Venado Tuerto. La tasa de secado se determinó ajustando un modelo lineal a mediciones periódicas de humedad post-madurez fisiológica en cada genotipo. Para la detección de QTLs se utilizó un modelo multi-atributo multi-ambiente para el conjunto de genotipos con regresión por mapeo de intervalos compuestos (CIM) en base a un mapa con más de 3000 SNPs. La variabilidad fenotípica en líneas e híbridos para tasa de secado fue menor que para el resto de los caracteres, lo que determinó una baja heredabilidad. La influencia del ambiente en la tasa de secado fue muy importante. Se encontraron correlaciones significativas entre la tasa de secado y caracteres como el tiempo a antesis y el stay green en la fecha de siembra tardía, lo que sugiere que ciertos atributos del genotipo serían importantes en ambientes que limiten la desecación. No se pudo establecer una relación entre las líneas y sus híbridos derivados para la tasa de secado. Se encontraron QTLs para algunos caracteres estudiados como tiempo a antesis, largo y número de chalas, y sólo uno para tasa de secado en líneas, aunque no fue consistente entre ambientes. Se concluye que la mejora genética para tasa de secado se ve limitada por su difícil fenotipificación y fuerte interacción con el ambiente. La elección de la

población de mapeo es asimismo sumamente importante para asegurar el éxito de los resultados en este tipo de atributos.

## ABSTRACT

Grain moisture at harvest is important in maize seed production; it affects grain quality and production costs. One of the main objectives of breeding is reducing grain moisture at harvest to reduce the economic impact of artificial drying. Besides maturity, the grain desiccation rate after physiological maturity has an impact in grain moisture at harvest. Phenotyping for grain desiccation is laborious, and associating grain desiccation with other traits of easier determination would be very useful. Furthermore, determining the genetic basis (QTL) of these traits is relevant for breeding. Finally, studying these traits and their genetic basis not only in lines but also in hybrids is highly important for their breeding exploitation. The objectives of the present thesis were (i) to phenotype a RILs population and derived hybrids for grain desiccation and other traits potentially associated to grain desiccation (time to anthesis, stay green, length and number of husk), (ii) to establish the correlations between grain desiccation in lines and hybrids, and the association with other measured traits, and (iii) to study the genetic basis (QTL) of grain desiccation in both lines and hybrids.

A biparental population of recombinant inbred lines (RILs,  $n=129$ ) and derived hybrids crossed with one tester ( $n=129$ ) were shown in two environments (early and late sowing date) in Venado Tuerto. Field grain drying rate was estimated adjusting a lineal model to grain moisture concentration data after physiological maturity for each genotype. QTL detection was done following a multi-trait multi-environment model for the entire set of genotypes using a composite interval mapping procedure (CIM) based on a map with more than 3000 SNPs. Phenotypic variation in grain desiccation in both lines and hybrids was lower than the rest of the traits, determining a low trait heritability. The influence of the environment on grain desiccation was very important. Significant correlations between grain desiccation and other traits such as time to anthesis and stay green were found only in late sowing date. These correlations suggest that variation of genotypes would be important in environments with a low rate of desiccation. There was no correlation for grain desiccation between lines and hybrids. QTL were detected for several of the studied traits, and one QTL was found for grain desiccation in lines, although it was not consistent between environments. It is concluded that breeding for grain desiccation is limited by the difficulties on phenotyping the trait, and the strong environmental influence. Future models for QTL detection should deal with these interactions.

## INTRODUCCIÓN

### *1. Importancia del maíz en la Argentina*

El maíz (*Zea mays L.*) es una especie gramínea originaria del continente americano, más específicamente del actual país de México. Es uno de los cereales que más importancia ha tenido en varios sectores de la economía a escala mundial, junto con el trigo, el arroz y la cebada (Doggett, 1988). En los países industrializados, el maíz se utiliza principalmente como forraje, materia prima para la producción de alimentos procesados y, recientemente para la producción de etanol. Por el contrario, en algunos países de América Latina y, cada vez más en países africanos, un gran porcentaje del maíz que se produce o se importa se destina a consumo humano (FAOSTAT, 2017).

El maíz es uno de los cultivos de mayor importancia en la Argentina. En los últimos 50 años la superficie destinada a la siembra de maíz tuvo disminuciones e incrementos, basadas en decisiones técnicas y económicas. La última década mostró un aumento muy marcado alcanzando un valor cercano a los 5 millones de hectáreas, explicado por una necesidad de rotación de lotes, desarrollo de nuevas áreas productivas, básicamente en el norte del país, y mayor rentabilidad en comparación a años anteriores. En tanto el rendimiento a nivel nacional mostró un incremento constante promediando 2 tn ha<sup>-1</sup> en 1960 hasta 7 tn ha<sup>-1</sup> en la década del 2000. Este incremento se debió a la introducción constante de mejoras genéticas en el cultivo y la introducción de nuevas técnicas productivas (FAOSTAT, 2017).

En la campaña 2016/17 se ha evidenciado un incremento en el área cultivada de maíz alcanzando las 4,6 millones de hectáreas, un 30% más en comparación con las 3,5 millones de hectáreas de la campaña 2015/16, básicamente por los cambios en la comercialización de granos en los cuales se quitó un derecho de exportación al maíz y generó una mayor competitividad del mismo en comparación con la soja. Durante la campaña 2015/16 la producción nacional de maíz fue de 29 millones de toneladas, esto lo posiciona como el segundo cultivo a nivel nacional en cuanto a superficie y volumen (USDA, 2017).

### *2. Manejo del cultivo e importancia del secado*

El cultivo de maíz en la Argentina es llevado a cabo casi en su totalidad bajo condiciones de secano. El agua es el principal recurso limitante. La fecha de siembra de un cultivo es la principal práctica de manejo que puede impactar tanto en el agua almacenada en el suelo durante el barbecho previo, como en la oferta durante su ciclo y en especial

durante el período crítico de floración (Andrade et al., 1999). Es de suma importancia el manejo de la misma para evitar que dicho período coincida con los momentos del año que presentan mayor probabilidad de ocurrencia de déficit hídricos (Maddonni, 2012).

Las fechas de siembra tradicionalmente recomendadas para la zona núcleo de producción (Sudeste de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos) son tempranas dentro de la estación de crecimiento, desde comienzos de septiembre hasta mediados de octubre (Cirilo y Andrade, 1994a, 1994b). El rendimiento potencial en estas fechas es el más alto dentro de la región, favorecido por la alta radiación y niveles óptimos de temperatura durante todo el ciclo del cultivo (Otegui et al., 2002; Maddonni, 2012). El periodo crítico de definición del rendimiento (i.e., 15 días centrados en la antesis del cultivo; Andrade et al., 1999) de estas fechas de siembra se ubica desde principios de diciembre a principios de enero, donde todavía no hay riesgo elevado de estrés hídrico. Un retraso de la fecha de siembra a noviembre ubica al periodo crítico durante el mes de enero, con mayor probabilidad de estrés hídrico.

La elección de una fecha de siembra tardía (diciembre) en el cultivo de maíz se está generalizando como una herramienta para diversificar el momento de ocurrencia del período crítico. Las fechas de diciembre lo ubican en febrero, mes que brinda un mejor status hídrico al cultivo y donde los niveles de radiación y temperatura son menores. En su conjunto estos factores (mayor oferta y menor demanda hídrica) generan una menor probabilidad de estrés hídrico. Estas fechas permiten lograr rendimientos aceptables en lotes con poca agua útil a la siembra o en suelos que por su génesis tienen poca capacidad de retener agua. La principal ventaja de las fechas de siembra tardías es que aumentan los rendimientos mínimos, otorgándole al productor una mayor estabilidad (Valdez et al., 2014; Bert y Satorre, 2012). El área sembrada con maíz tardío ha aumentado considerablemente durante los últimos 15 años, coincidente con el momento en que entra la tecnología Bt al mercado argentino. Mientras el porcentaje de tempranos/tardíos era originalmente 80/20, hace tan solo cinco años, fue de 70/30 durante la campaña 2008/2009 y 60/40 desde el 2011/2012 a la actualidad (Gambin et al., 2016).

El maíz sembrado en diciembre no era originalmente recomendado por varias razones. En primer lugar la incidencia de insectos (principalmente *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea saccharalis*) de difícil control se veía como un factor limitante para fechas tardías. Las tecnologías disponibles para el control de insectos (germoplasma con biotecnología Bt principalmente) han cambiado drásticamente esta situación. Actualmente existen otras limitaciones bióticas muy dependientes del año como la mayor incidencia de enfermedades, aspecto que ha sido priorizado en el mejoramiento genético logrando avances significativos.

Sin embargo, un importante problema actual y consistente año a año de las fechas de siembra tardías es que el secado del grano post-madurez fisiológica es muy lento y la humedad a cosecha en general muy alta (Gambin y Borrás, 2014). El secado ocurre durante los meses de abril, mayo y junio, cuando la humedad relativa media del aire es muy alta y dificulta el secado a campo de la espiga. La presente tesis pretende focalizarse en este atributo de importancia para el productor y la industria.

Para entender los factores que influyen en el secado del grano primero es necesario entender cómo crecen los granos. El crecimiento del grano puede considerarse como la sucesión de tres etapas (Saini y Westgate, 2000). La primera, denominada fase lag, tiene lugar durante los 15 días post fecundación del ovario. Esta etapa se caracteriza por una activa división celular, donde quedan establecidos el número de células endospermáticas y amiloplastos involucrados en la posterior deposición de almidón. Por lo tanto, esta etapa es considerada crítica en la definición del peso de grano potencial (Brocklehurst, 1977; Capitano et al., 1983; Reddy y Daynard, 1983; Ober et al., 1991; Jones et al., 1996). La acumulación de biomasa durante esta primera etapa es lenta, y se caracteriza por una rápida acumulación de agua (Egli et al., 1985; Westgate y Boyer, 1986). La segunda etapa de crecimiento del grano, llamada de llenado efectivo, se caracteriza por una activa acumulación de reservas en el grano, en cereales fundamentalmente almidón. La entrada de agua continúa hasta algún momento variable de acuerdo a la especie (Egli y TeKrony, 1997), a partir del cual comienza el descenso del contenido hídrico dentro del grano. Así, el balance de las economías de agua y materia seca del grano a lo largo de todo el llenado determina una caída progresiva del porcentaje de humedad, hasta alcanzar un valor crítico que está asociado al cese de acumulación de materia seca (Egli y TeKrony, 1997; Westgate, 1994; Saini y Westgate, 2000; Gambin y Borrás, 2005). Este valor crítico varía entre especies (Egli y TeKrony, 1997), y su llegada indica que el cultivo ha alcanzado madurez fisiológica, definida como el momento en donde se alcanza el máximo peso seco del grano (y rendimiento). La tercera etapa se caracteriza por constancia del peso seco y pérdida continua de humedad del grano (Bewley y Black, 1985), desde el valor crítico a madurez fisiológica hasta el correspondiente a madurez de cosecha.

El secado del grano previo a madurez fisiológica (desde ca. 85% a ca. 30% de humedad en base fresca) es particularmente estable entre genotipos y condiciones ambientales y depende de la estrecha relación en la acumulación de biomasa y agua en el grano (Gambin et al., 2007). Lo mismo ocurre con el valor crítico de humedad al cual se alcanza la madurez fisiológica, el cual es estable para diferentes genotipos de una misma especie (Borrás y Westgate, 2006; Swank et al., 1987). Sólo condiciones de estrés muy

extremas como una defoliación puede provocar una aceleración en la caída del porcentaje de humedad previo a la madurez fisiológica y/o un aumento en el valor crítico (Tollenaar y Daynard, 1978).

Por el contrario, el secado post-madurez fisiológica es altamente dependiente de variables climáticas relacionadas con la humedad relativa del aire y la demanda atmosférica (Schmidt y Hallauer, 1996). Sin embargo, el genotipo también tiene influencia en el secado. El momento en el que el genotipo alcanza la madurez fisiológica influye en la tasa de secado indirectamente modificando las condiciones climáticas al cual se expone esta etapa (Sala et al., 2006), pero se ha encontrado influencia de otras características del genotipo independientes de la madurez como lo ajustado de las chalas (Troyer y Ambrose, 1971; Hicks et al., 1976), peso hectolítrico del grano (Troyer y Ambrose, 1971; Cross, 1985), espesor y permeabilidad del pericarpio (Crane et al., 1959), o la forma y el tamaño del grano (Cross, 1985; Hunter et al., 1979). En la actualidad existen fuertes diferencias en humedad a cosecha entre genotipos comerciales de maíz de similar madurez, sobre todo en fechas de siembra tardías (Gambín y Borrás, 2014), y no es claro qué características del genotipo pueden estar influyendo en estas variaciones. Caracteres como número de chalas, largo de chalas y stay green muestran importante variación entre genotipos actuales en los programas de mejora y podrían tener asociación con la tasa del secado del grano. Estos aspectos aún no han sido explorados.

Estudiar la influencia del genotipo en el secado es de gran importancia en Argentina, donde casi el 80% del maíz producido se cosecha con un contenido de humedad superior a la establecida para recibo. Es el grano que más se seca artificialmente en nuestro país y en todos los países productores de este cereal. La humedad de grano a cosecha es de vital importancia para la producción de maíz, ya que afecta la calidad del grano y los costos de producción. Es un factor que puede causar dificultades en la cosecha, secado artificial, almacenaje, transporte y procesamiento de granos (Wang et al., 2012). Uno de los principales objetivos del mejoramiento genético es reducir el contenido de agua del grano a cosecha para disminuir el impacto económico del secado artificial (Dijak et al., 1999; Sweeney et al., 1994).

### *3. Detección de QTLs para secado*

Muchos de los caracteres de importancia agronómica, como el rendimiento, el número de granos o el secado del grano, son caracteres cuantitativos complejos afectados por muchos genes y el ambiente y normalmente muestran fuertes interacciones entre ellos. La arquitectura genética se refiere al número y localización en el genoma de los genes que

afectan un determinado carácter, la magnitud de sus efectos y la contribución relativa de los efectos aditivos, dominantes y epistáticos. Según Holland (2007), para comprender la arquitectura de genes complejos en plantas, los objetivos de las investigaciones futuras deben combinar diferentes avances en estadística, fisiología y herramientas genéticas.

La conexión entre genes y fenotipos puede enfocarse usando métodos de mayor a menor escala o “top-down”, o métodos de menor a mayor escala o “bottom-up” (Hammer et al., 2006). Se ha anticipado que el tipo de enfoque “bottom-up”, o partir de genes, permitiría una mejora en la eficiencia del mejoramiento de cultivos. Sin embargo, para caracteres complejos no se ha cumplido. Integrar los efectos de genes y sus interacciones a lo largo de diferentes escalas de organización hasta predecir un fenotipo complejo puede resultar errático y sumamente complejo. Existen diferentes regulaciones en cada uno de los niveles que no permiten escalar directamente desde el gen al fenotipo (Hammer et al., 2006). Los métodos “top-down” comienzan con el fenotipo y usan la disección fisiológica para llegar al nivel genómico molecular (Hammer et al., 2005). Este es el enfoque clásico usado para estudiar la arquitectura genética de los caracteres complejos, observar variación fenotípica e intentar determinar un modelo genético adecuado para explicar la variación fenotípica (Reymond et al., 2003; Messina et al., 2009).

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

Para construir un mapa de ligamiento pueden usarse diferentes tipos de poblaciones (i.e., F<sub>2</sub>, retrocruzadas, dobles haploides, líneas recombinantes, etc.). Es crítico que existan suficientes polimorfismos y contar con marcadores moleculares que revelen estas diferencias. Los marcadores surgen de diferentes clases de mutaciones en el ADN, ya sean mutaciones puntuales, re-arreglos cromosómicos (inserciones o deleciones), apareamiento desigual y errores de la ADN polimerasa (Collard et al., 2005).

Existen diferentes métodos para detectar QTL (e.g., análisis de un único marcador, análisis por intervalos simples, análisis por intervalos compuestos; Collard et al., 2005). El método más simple es el análisis de un solo punto o un solo marcador. No requiere un mapa

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

La disponibilidad de tecnologías de marcadores moleculares provee nuevas formas de analizar la herencia de caracteres complejos, como punto de partida para la selección asistida por marcadores (MAS) (Xu y Crouch, 2008). MAS puede ser utilizada para mejorar los esfuerzos de mejoramiento y para acelerar el desarrollo de líneas endocriadas (Asins, 2002). Para el caso particular de secado en maíz, existen pocas evidencias de QTL para tasa de secado (Sala et al., 2006; Wang et al., 2012) y los mismos no consideran la influencia de otros caracteres, aspecto que pretende considerarse en la presente tesis.

Finalmente, es importante remarcar que cualquier información de las líneas parentales que indique la performance del híbrido derivado es altamente deseable para eliminar la necesidad de conducir elevada cantidad de experimentos. Estudios sobre algunos caracteres como rendimiento en grano, altura de planta y prolificidad han mostrado baja correlación entre líneas parentales y los híbridos derivados (Hallauer et al., 2010), lo que estaría explicado por la baja heredabilidad de los caracteres (Sadras y Slafer, 2012). Otros caracteres de mayor heredabilidad han mostrado correlación entre líneas e híbridos, como aquellos relacionados con el llenado de granos (Alvarez Prado et al., 2013b) o fenología (D'Andrea et al., 2013). Si bien existen evidencias de correlación entre líneas e híbridos para humedad a cosecha (Austin et al., 2000; Beavis et al., 1994; Melchinger et al., 1998; Mihaljevic et al., 2005), no es así para la tasa de secado.

### Objetivo general:

Estudiar las bases genéticas de la pérdida de humedad del grano a partir de madurez fisiológica en líneas de una población biparental de RILs (líneas endocriadas recombinantes) e híbridos derivados.

### Objetivos específicos:

1. Caracterizar fenotípicamente una población de líneas e híbridos derivados para tasa de secado y diversos caracteres a nivel de planta potencialmente asociados con la tasa de secado (tiempo térmico a antesis, stay green, largo de chalas y número de chalas).
2. Establecer la correlación entre la tasa de secado en líneas e híbridos, y su relación con los otros caracteres fenotípicos medidos.
3. Estudiar las bases genéticas (QTLs) de la tasa de secado tanto en líneas como en híbridos.

### Hipótesis:

1. La población estudiada presenta variación fenotípica para los caracteres medidos y se espera la misma variación en los híbridos derivados.
2. Se puede predecir el carácter tasa de secado de grano a partir de uno o más caracteres fenotípicos más fácilmente medibles como el tiempo a antesis, el stay green de planta, el número de chalas y el largo de chalas.
3. Existe una alta correlación entre la tasa de secado de granos de las líneas parentales y sus híbridos derivados.
4. Existen diferencias genotípicas para los caracteres medidos y estas diferencias se pueden asociar a marcadores moleculares específicos (QTL), tanto en líneas como en híbridos derivados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *1. Material vegetal*

Se utilizó una población biparental de RILs de maíz de 129 líneas F<sub>8</sub> y sus padres (parental 1 y 2), desarrolladas por el departamento de investigación maíz de Nidera S.A. El número de individuos evaluados es un aspecto importante en estudios de detección de QTL para caracteres complejos (Bernardo, 2008).

Los parentales son de germoplasma templado, pertenecientes al grupo heterótico Flint, y fueron elegidos por su diferente tasa de secado y stay-green en base a observaciones previas a los presentes experimentos. De esta forma se supone que las RILs derivadas presentan variabilidad en estos caracteres, aunque no existen experimentos previos que lo demuestren.

Todas las RILs fueron cruzadas por un probador común para obtener 129 híbridos simples. El probador (tester) es de germoplasma templado, del grupo heterótico Lancaster (dentado), con características de tasa de secado y stay green intermedias a los parentales de la población.

### *2. Experimentos a campo*

Se llevaron a cabo dos experimentos en el Campo Experimental El Recuerdo, Nidera S.A., en Venado Tuerto, Argentina (33°43 S, 60°03 O; 115 metros snm) durante la campaña 2015/2016. Se utilizaron dos fechas de siembra, una temprana (noviembre) y una tardía (diciembre). Originalmente la fecha temprana estaba planeada para el mes de octubre ya que es la fecha óptima en la zona del experimento (Otegui et al., 2002) pero por exceso de lluvias debió retrasarse al mes de noviembre. Las siembras tuvieron lugar el 5 de noviembre y el 18 de diciembre del 2015.

El suelo donde se condujeron los ensayos en un Argiudol Típico de textura franco limosa (Soil Taxonomy, Soil Survey Staff 2010). Los experimentos se sembraron con una sembradora neumática experimental en un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones. Cada repetición consistió en cuatro surcos de 0,52 m de distancia y 5 m de largo. La densidad de siembra objetivo fue de 85.000 plantas ha<sup>-1</sup> (la densidad lograda estuvo en promedio alrededor ese valor). Los ensayos se mantuvieron libres de malezas, plagas y enfermedades durante todo el ciclo, mediante dos aplicaciones de herbicidas (Atrazina y Metolacoloro) e insecticidas (Clorpirifos) en pre emergencia del cultivo y estadio V3 del cultivo, no fue necesaria la aplicación de fungicidas.

A la siembra se aplicaron 300 kg ha<sup>-1</sup> de Urea y 150 kg ha<sup>-1</sup> de MAP (fosfato mono amónico) azufrado en ambos experimentos.

Se registraron datos diarios de temperatura, precipitaciones y humedad relativa durante el ciclo del cultivo a través de una estación meteorológica Pegasus EP2010, ubicada aproximadamente a 100 metros de los experimentos. Además se calcularon los valores diarios de déficit de presión de vapor (DPV) y evapotranspiración potencial (ET<sub>0</sub>).

El déficit de presión de vapor se calculó como (ecuación 1):

$$\text{DPV (kPa)} = ((100 - \text{HR}) / 100) \times \text{PVS} \quad (1)$$

donde HR es la humedad relativa y PVS es la presión de vapor saturado (Murray, 1967).

La evapotranspiración potencial se calculó como (ecuación 2):

$$\text{ET}_0 \text{ (mm/día)} = 0,0135 \times (\text{T}_{\text{med}} + 17,78) \times \text{R}_s \quad (2)$$

donde T<sub>med</sub> es la temperatura media y R<sub>s</sub> es la radiación solar incidente (Hargreaves y Samani, 1985).

### 3. Mediciones fenotípicas

En cada experimento se tomaron las siguientes determinaciones fenotípicas por parcela:

Tiempo a antesis: cuando el 50% de las plantas tenía sus estigmas visibles por fuera de las chalas (Ritchie y Hanway, 1982). Se calculó el tiempo térmico a antesis como la duración en °Cd del período comprendido entre la siembra y la antesis (Monteith, 1977, ecuación 3):

$$\text{TT (°C d)} = D (\text{T}_m - \text{T}_b) \quad (3)$$

donde TT es el tiempo térmico acumulado, D es el número de días, T<sub>m</sub> la temperatura media diaria y T<sub>b</sub> la temperatura base (8 °C; Otegui et al., 1992).

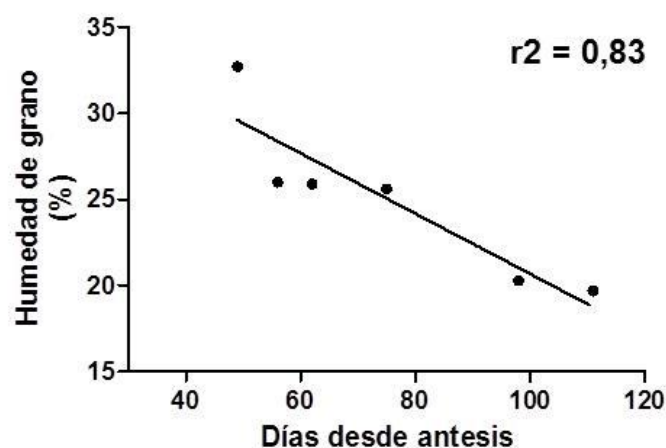
Humedad de grano y tasa de secado post madurez fisiológica: se realizaron mediciones cada 5-7 días de humedad de los granos, comenzando cuando el promedio de los genotipos tenía un 32% de humedad del grano (alrededor de la madurez fisiológica, 45 días post antesis aproximadamente) hasta el momento en el que el promedio de los genotipos alcanzó

un 18% de humedad, siguiendo el procedimiento de muestreo de espiga propuesta por Borrás et al. (2003). La humedad fue determinada utilizando un humidímetro marca Wile55. El principio de funcionamiento del mismo está basado en la medición de una corriente alterna de alta frecuencia que es aplicada a través de la muestra. El instrumento convierte el vapor de dicha muestra en un valor de humedad gracias al uso de escalas o tablas de calibración que están programadas en la memoria del medidor.

La tasa de secado se determinó utilizando un modelo de regresión lineal entre humedad y días a partir de madurez fisiológica (considerada como 32% de humedad del grano; Borrás et al., 2003, Gambín et al., 2007) para cada combinación de experimento x genotipo x repetición (ecuación 4):

$$\text{Humedad (\%)} = a + b X \quad (4)$$

donde  $a$  es la ordenada al origen,  $b$  es la tasa de secado ( $\% \text{ día}^{-1}$ ) y  $X$  es el día desde madurez fisiológica. Los ajustes fueron realizados usando el programa GraphPad Prism V5.0 (Radushev, 2007). Los  $r^2$  de los modelos variaron de 0,86 a 0,89 y de 0,74 a 0,75 en siembras tempranas y tardías, respectivamente. Un ejemplo de ajuste del modelo se muestra en la Fig. 1, donde la tasa de secado fue  $-0,17 \% \text{ día}^{-1}$ , lo que significa una caída de humedad del 13 % en 62 días.



**Fig. 1.** Ejemplo del modelo lineal ajustado a los datos de humedad post madurez fisiológica (datos de una RIL -X3EAC03-B-409- en una repetición en siembra temprana) para determinar la tasa de secado.

Largo de chalas: en una planta representativa por parcela se procedió a medir el largo de la chala de mayor longitud y el largo de la espiga una vez removidas. El largo de chalas está expresado en centímetros como la diferencia entre el largo de chalas y el largo de espiga (valores positivos: chalas más larga que la espiga; valores de cero: chalas y espiga de igual longitud; valores negativos: chalas de menor longitud que la espiga).

Número de chalas: determinado en la misma espiga cosechada para las mediciones de largo de chalas. Se procedió con cuidado a remover y contar todas las chalas presentes.

Stay green: se define como una característica de ciertas plantas donde el proceso de senescencia foliar está demorado, esto significa que estas plantas permanecen verdes por más tiempo, demorando así el envejecimiento (senescencia de las hojas) (Thomas y Smart, 1993).

Se realizaron mediciones semanales desde madurez fisiológica de planta completa utilizando una escala visual interna de Nidera. Dicha escala va de uno a nueve. Una planta con todas sus hojas verdes corresponde a un valor de uno, por el contrario una planta totalmente seca corresponde a un valor de nueve. Un valor intermedio, cuando la planta tiene sus hojas basales secas hasta la altura de la espiga corresponde a un valor cinco. Se registró un valor por parcela en base a la observación conjunta de las plantas. Esta determinación siempre fue registrada por la misma persona.

Rendimiento: en madurez de cosecha a partir de una superficie de cosecha de 2,6 m<sup>2</sup>. Las espigas fueron trilladas usando una trilladora estática. Todas las muestras fueron sujetas a análisis de humedad utilizando el humidímetro para la posterior corrección a peso seco.

#### *4. Análisis de datos fenotípicos*

Para obtener la variación individual de los caracteres evaluados, se ajustó un modelo lineal mixto (paquete lme4; función lmer; Bates et al., 2015) en R (R Core Team 2016, versión 3.3.2) individualmente para cada carácter. El modelo incluyó ambientes (fechas de siembra), repetición anidada dentro de ambientes, tipo (línea o híbrido), genotipo anidado dentro de tipo y las interacciones tipo x ambiente y genotipo x ambiente. Los ambientes y los bloques dentro de ambientes fueron considerados como efectos fijos, mientras que tipo, genotipo, y las interacciones se consideraron efectos aleatorios. Los modelos fueron ajustados mediante REML (máxima verosimilitud restringida). A partir de las varianzas se estimó la heredabilidad en sentido amplio de cada carácter como (ecuación 5):

$$H^2 = \sigma^2_G / [\sigma^2_G + (\sigma^2_{GE} / \eta) + (\sigma^2_e / r \eta)] \quad (5)$$

donde  $\sigma^2_G$  es la varianza genotípica,  $\sigma^2_{GE}$  es la varianza genotipo x ambiente,  $\sigma^2_e$  es la varianza residual y  $\eta$  y  $r$  son el número de ambientes y las repeticiones respectivamente (Hallauer y Miranda, 1988).

Se calculó la heterosis promedio de los padres como la superioridad del híbrido derivado comparado con el valor promedio de los parentales (Hallauer et al., 2010; ecuación 6):

$$\text{Heterosis (\%)} = [(H - L)/L] \times 100 \quad (6)$$

donde H es la media del híbrido derivado y L es la media de los parentales.

Para el análisis de QTL los datos fenotípicos fueron analizados usando un modelo mixto siguiendo el procedimiento de Malosetti et al. (2008). Los datos multi-atributo multi-ambiente multi-tipo consistieron en I genotipos anidados J tipos (líneas e híbridos), evaluados en K ambientes con mediciones de L atributos y M repeticiones (I = 129, J = 2, K= 2, L = 6 y M = 2). Cada atributo final estuvo formado por la combinación del atributo, el tipo y el ambiente. Esto es: seis atributos medidos (tasa de secado, tiempo térmico a antesis, largo de chalas, número de chalas, stay green y rendimiento), en dos tipos (línea e híbrido), en dos ambientes (temprano y tardío) obteniendo 24 atributos finales. Se definió un N x 1 vector "y", con N = IJKLM que contiene todas las observaciones ordenadas por atributo dentro de cada ambiente, genotipo dentro de cada tipo y repetición. Dado que el interés principal es la variación genética dentro de la población más que los genotipos *per se*, se asumió a los genotipos como efectos aleatorios. Las combinaciones atributo por ambiente (A-A) y tipo anidado en A-A fueron consideradas efectos fijos. El modelo mixto lineal para el análisis MTME fue el siguiente (ecuación 7):

$$Y = X\beta + Zu + \varepsilon \quad (7)$$

donde Y es el vector de la observación fenotípica,  $\beta$  representa un vector de efectos fijos debido a la combinación de A-A y de tipo anidados dentro de la combinación A-A, mientras que u y  $\varepsilon$  son los vectores de los efectos aleatorios debido a los genotipos, a los bloques anidados dentro de la combinación A-A 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  $\beta$  contiene las medias de los caracteres dentro de los ambientes a través de los genotipos y las medias de los tipos dentro de la combinación A-A. El vector  $u$  denota los efectos genotípicos aleatorios para cada tipo dentro de A-A. Los efectos genotípicos aleatorios se asumen normalmente distribuidos  $u \sim N(0, G)$ , siendo  $G$  una matriz de bloques diagonales con  $24 \times 24$  parámetros de variancia-covariancia. Finalmente,  $\epsilon$  es un vector de residuales no genéticos asociados con cada observación y normalmente distribuidos  $\epsilon \sim N(0, R)$  siendo  $R$  la variancia residual ( $I\sigma_{ijk}^2$ ). La covariancia fenotípica está dada por (ecuación 8):

$$V(y) = ZGZ' + R \quad (8)$$

La diagonal de la matriz  $G$  incluye las varianzas genéticas de cada combinación de tipo dentro de A-A (T\_A-A) y fuera de la diagonal las covarianzas genética entre cada par de T\_A-A para el mismo genotipo. Como señalaron Malosetti et al. (2008) los efectos genéticos aleatorios no serán independientes a través de ambientes si existen genes/QTL con efectos estables en esos ambientes. Además, los efectos genéticos para los diferentes caracteres no serán independientes si los genes/QTL están ligados o existen pleiotropía. Frecuentemente, los efectos de los QTL a través de los ambientes no son iguales en magnitud e incluso, a veces, tampoco lo son en signo, dando lugar a varianzas genéticas heterogéneas. De esta manera, se asumió una estructura de varianzas y covarianzas para la matriz  $G$  del tipo *factor analytic*. Este modelo asume variancias y covariancias heterogéneas para cada combinación T\_A-A. A partir del modelo se estimó el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para cada genotipo en cada ambiente (Borevitz et al., 2002; Zalapa et al., 2007).

Se realizó un análisis de correlación Pearson entre los BLUPs obtenidos de los atributos medidos, para líneas e híbridos, en ambos ambientes (siembras temprana y tardía).

### 5. Análisis de genotipado

La información genética cruda de genotipado por marcadores moleculares de alto caudal fue provista por la empresa Eurofins-BioDiagnostics Inc. (507 Highland Drive, River Falls, WI 54022, US). Las 129 RILs y parentales fueron caracterizados genéticamente con 56.110 SNPs (polimorfismo de nucleótido simple) distribuidos homogéneamente derivados del genoma de referencia del cultivar B73, utilizando la tecnología Illumina MaizeSNP50 BeadChip (Ganal et al., 2013).

Para el análisis de los datos crudos de genotipado en primer lugar se identificaron y eliminaron los SNPs monomórficos de los 10 cromosomas, se imputaron los valores de los parentales que tuvieran dato faltante pero segregasen en la población y se eliminaron las posiciones heterogéneas para al menos uno de los parentales. La matriz resultante contenía 17.076 de los 56.110 marcadores originales. Con la matriz obtenida se ingresó a R utilizando el paquete estadístico R/QTL (Broman et al., 2003) a través del cual se eliminaron los individuos con menos del 80% de los SNPs genotipados y los marcadores con datos faltantes en más del 20% de los individuos. Luego se identificaron aquellos individuos con alta probabilidad de encontrarse duplicados mediante un análisis de similitud. Se identificaron marcadores duplicados agrupando aquellos que diesen la misma información y se seleccionó el representante de cada grupo con menor número de posiciones con datos faltantes. Tras este paso la matriz contuvo 3.901 marcadores.

Finalmente se evaluaron los patrones de segregación de los marcadores mediante un test de chi-cuadrado ( $X^2$ ) y se eliminaron aquellos en los que se encontrasen distorsionados de la segregación mendeliana 1:1 (Kearsey y Pooni, 1996) con un valor p de 0,05 y una corrección de Bonferroni (Dunn, 1961) por testeo múltiple. Se eliminaron 136 marcadores por lo que la matriz quedó con 3.765 SNPs. Para concluir se estimaron las frecuencias de recombinación entre los marcadores permitiendo observar una buena coherencia para el orden teórico de los mismos según la posición física reportada para cada uno. Por este motivo, y dado que no se contaba con el hardware necesario para estimar el mapa genético dado el alto número de marcadores y líneas, se decidió utilizar las posiciones del mapa físico como coordenadas de los SNPs para realizar el análisis de QTL.

#### *6. Análisis de QTL multi-atributo multi-ambiente multi-tipo*

Las medias fenotípicas (BLUPs) (mejor predictor lineal insesgado) calculadas usando el modelo mixto fueron utilizadas para el mapeo de QTLs. Sin embargo, el mapeo fue hecho utilizando un modelo mezcla (Jiang y Zeng, 1995) en lugar de un modelo mixto siguiendo la metodología utilizada por Alvarez Prado et al. (2013a) y Spagnolli et al. (2016). La decisión se basó en la mayor precisión de los modelos mezcla respecto a los modelos mixtos cuando la ubicación de los QTLs no proviene de mapas de saturados. En los modelos mezcla el término residual de la ecuación es el único efecto aleatorio (ecuación 9):

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (9)$$

donde los parámetros son los mismos que los de la ecuación anterior (ecuación 7). Los modelos mezcla asumen que el efecto residual  $\epsilon_{JK}$  están correlacionados entre atributos dentro de individuos con covarianza  $Cov(\epsilon_{JK}, \epsilon_{JL})$  y son independientes entre individuos (Jiang y Zeng, 1995). Para los análisis de verosimilitud se asume que  $\epsilon_{JKs}$  son multivariados y con distribución normal entre los individuos con media cero y una matriz de varianzas – covarianzas desestructurada.

El modelo incluyendo los QTLs putativos es el siguiente (ecuación 10):

$$Y = X\beta + x^{QTL} a + \epsilon \quad (10)$$

donde  $x^{QTL}$  es una matriz diseño, derivada de la información de los marcadores moleculares. El término  $a$  es un vector de efectos fijos de QTLs. Finalmente la extensión de un modelo de QTL único a uno multi-QTL es (ecuación 11):

$$Y = X\beta + \sum_Q X_q^{QTL} a_q + \epsilon \quad (11)$$

Para este análisis se siguió un procedimiento de escaneo del genoma completo con tests para QTLs conjuntos considerando correlaciones entre atributos y ambientes para cada tipo. Se realizó un análisis de regresión utilizando la opción CIM (mapeo por intervalos compuestos) del WinQTL Cartographer V2.5 (Wang et al., 2011). El CIM fija parámetros para cada posible QTL dentro de un intervalo al mismo tiempo que fija coeficientes de regresión parciales para el resto de los marcadores para ajustar la varianza causada por QTLs no objetivos, de esta forma el análisis CIM da mayor poder y precisión al análisis.

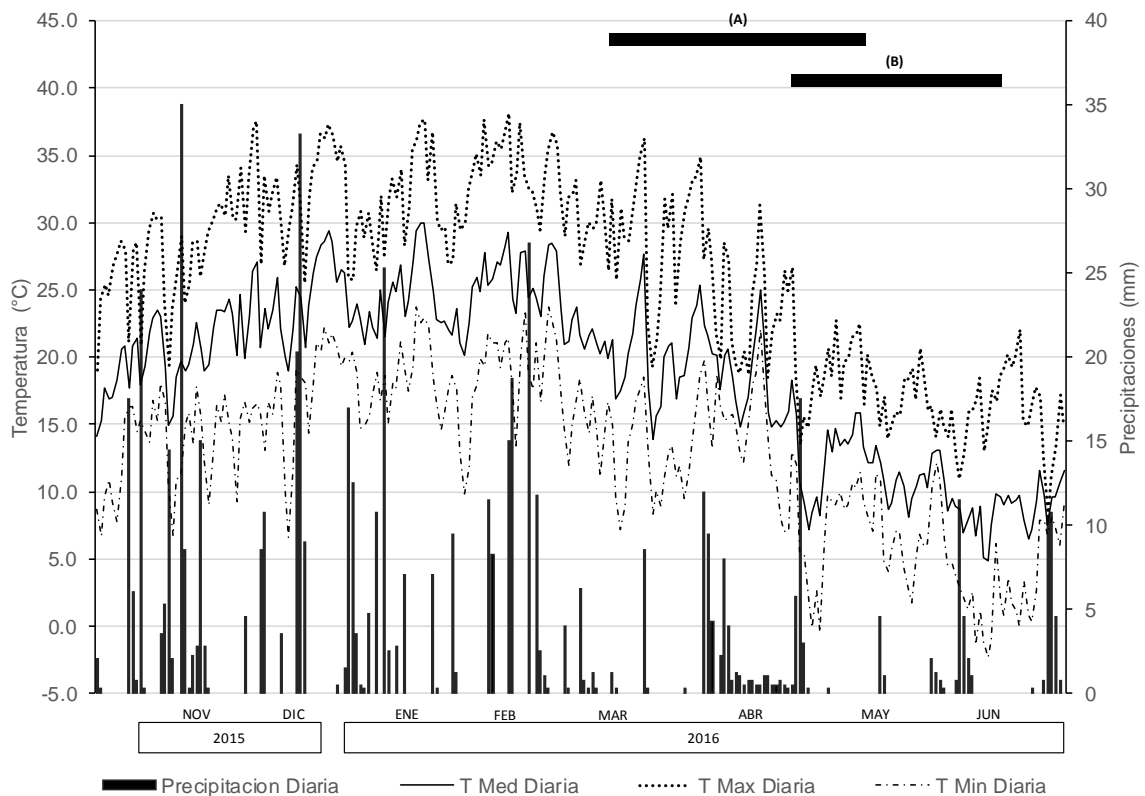
El límite para declarar la presencia de un QTL conjunto significativo fue un LOD (logaritmo de Odds) = 12, y un intervalo de escaneo de 2 pares de bases entre marcadores y posibles QTLs. Las posiciones de los QTLs fueron asignadas a las regiones relevantes en el punto de máximo LOD. Para cada QTL conjunto se observaron qué atributos fueron significativos. Para ello se consideró un LOD de 2,5. Por último, todos los QTLs conjunto fueron testeados en un modelo de predicción para cada combinación de atributo-ambiente-tipo y se observó el porcentaje de la varianza fenotípica explicada por los QTLs.

## RESULTADOS

### 1. Condiciones climáticas

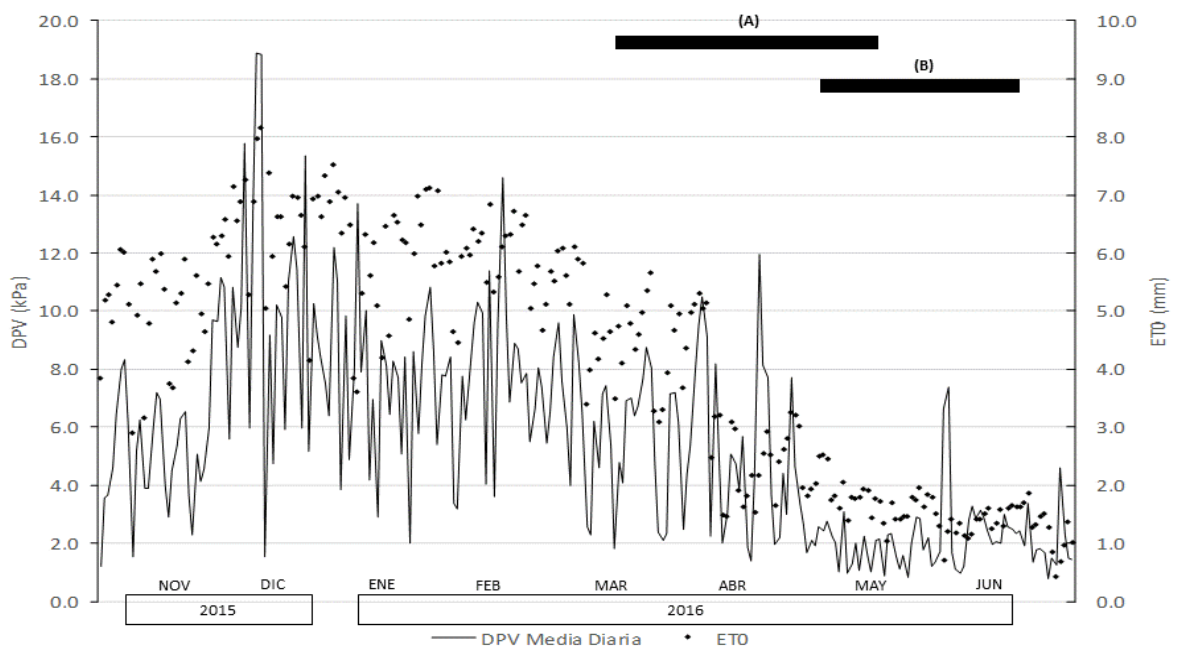
Las precipitaciones durante la campaña 2015-16 acumularon 450 mm desde siembra a madurez fisiológica para la fecha de noviembre y de 370 mm durante el mismo período para la fecha diciembre. Se puede observar las escasas precipitaciones ocurridas durante el mes de Marzo (19 mm) en comparación con los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero que acumularon en promedio 100 mm cada uno (Fig. 2).

Las temperaturas medias promedio fueron de 19°C, 24°C, 24°C, 25°C, 20°C, 16°C, 12°C y 9°C, para los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo, abril, mayo y junio respectivamente. Se registraron temperaturas máximas de hasta 38°C en los meses de diciembre, enero y febrero, y mínimas de -2 °C en los meses de mayo y junio (Fig. 2). Mientras que las condiciones durante el ciclo fueron similares en ambas fechas, las condiciones durante el secado fueron contrastantes entre fechas, principalmente debido a diferencias en las temperaturas (Fig. 2).



**Fig. 2.** Precipitaciones diarias y temperaturas medias (*T Med*), máximas (*T Max*) y mínimas (*T Min*) diarias; desde Noviembre de 2015 hasta Junio de 2016. Las barras superiores indican el período de las mediciones de tasa de secado, (A): siembra temprana y (B): siembra tardía.

Los períodos comprendidos entre el inicio y el fin de las mediciones de humedad de grano (a través del cual se determinó la tasa de secado de los granos) tanto en las RILs como en los híbridos trascurrieron bajo condiciones de baja temperatura, bajo déficit de presión de vapor, y baja ET<sub>0</sub> en las fechas de siembra temprana y tardía. A su vez, la fecha tardía evidenció durante este período valores medios inferiores a la fecha más temprana, para temperatura media del aire (10,6°C y 18,2°C respetivamente), déficit de presión de vapor (2,2 kPa y 4,8 kPa respectivamente) y ET<sub>0</sub> (1,6 mm y 3,4 mm respectivamente).



**Fig. 3.** Déficit de presión de vapor medio diario (DPV) y evapotranspiración potencial diaria (ET<sub>0</sub>); desde Noviembre de 2015 hasta Junio de 2016. Las barras superiores indican el período de las mediciones de tasa de secado, (A): siembra temprana y (B): siembra tardía.

## 2. Caracterización fenotípica de líneas

Los padres de la población de RIL mostraron similar tiempo a antesis en ambas fechas ( $p > 0,05$ ; Tabla 1). Los genotipos de la población de RIL mostraron poca variación en tiempo a antesis (Tabla 1). El tiempo térmico acumulado de siembra a antesis varió entre RILs de 1.005 y 1.216 °Cd en la fecha temprana y de 955 a 1.181 °Cd en la fecha tardía. Estos valores corresponden a alrededor de 10 y 9 días de diferencia entre la primera y última línea en fecha temprana y tardía, respectivamente. Esto determinó a las líneas transcurrir el periodo de llenado en similares condiciones ambientales dentro de cada fecha de siembra. El 46% de la variación en este atributo fue debido a diferencias entre líneas y el

35% fue debido a diferencias entre ambientes. La variación dada por la interacción genotipo x ambiente fue baja (8%; Tabla 1).

**Tabla 1.** Tiempo a antesis, tasa de secado de granos, stay green, número de chalas, largo de chalas y rendimiento para las líneas parentales y media, mínimo y máximo para 129 RILs en dos ambientes (siembra temprana y tardía). Para cada atributo se muestra el % de la varianza total asociada a cada componente.

Ambiente	Genotipo	Tiempo a antesis (°Cd)	Tasa secado de grano (% día <sup>-1</sup> )	Stay green (1 a 9)	Número chalas (#)	Largo chalas (cm)	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )
Temprano	Parental 1	1.105	-0,22	3,0	8	8,5	2.852
	Parental 2	1.047	-0,23	4,5	8	7,5	4.875
	RIL Media	1.095	-0,21	3,2	7	6,2	3.302
	RIL Min	1.005	-0,42	1,0	5	-2,0	310
	RIL Max	1.216	-0,05	9,0	11	14,0	8.772
Tardío	Parental 1	1.043	-0,13	4,5	9	7,5	2.357
	Parental 2	1.023	-0,20	7,5	8	8,5	2.124
	RIL Media	1.051	-0,18	5,5	7	7,2	2.153
	RIL Min	955	-0,50	1,0	5	-4,0	0
	RIL Max	1.181	-0,01	9,0	16	15,0	8.407
<i>Varianzas (%)</i>							
<i>Gen</i>		46	2	32	25	39	36
<i>Amb</i>		35	13	45	<1	6	23
<i>Gen*Amb</i>		8	1	9	13	7	12
<i>Rep(Amb)</i>		1	<1	1	1	2	1
<i>Residual</i>		10	84	12	61	47	29

La tasa de secado de grano no difirió significativamente ( $p>0,05$ ) entre los parentales en la siembra temprana (-0,22 y -0,23 % día<sup>-1</sup>; Tabla 1) y en la siembra tardía (-0,13 y -0,20 % día<sup>-1</sup>; Tabla 1). La media de las RILs mostró valores similares a los padres (-0,21 y -0,18 % día<sup>-1</sup> para siembra temprana y tardía respectivamente; Tabla 1) aunque evidencia segregación transgresiva para dicho carácter. La tasa de secado entre líneas varió desde -0,42 a -0,05 % día<sup>-1</sup>, fecha temprana y de -0,50 a -0,01 % día<sup>-1</sup> en fecha tardía; (Tabla 1). A pesar de ello, la variación entre genotipos fue baja (2% del total de la varianza; Tabla 1). La variación entre ambientes fue mayor (13%, siendo en promedio menor el secado en fecha tardía) aunque es evidente el importante residual para este atributo (84%; Tabla 1). La interacción genotipo x ambiente también fue baja (1%).

El stay green no difirió significativamente entre los parentales en siembra temprana (3 y 4,5 para el parental 1 y 2 respectivamente; Tabla 1) o tardía (4,5 y 7,5; Tabla 1), aunque el parental 1 siempre fue más stay green que el parental 2. La media de las RILs fue mayor en la fecha tardía respecto a la temprana (5,5 y 3,2, respectivamente; Tabla 1), y variaron similarmente en ambas fechas (de 1 a 9; Tabla 1). El 45% de la variación de este atributo

estuvo dado por el ambiente, el 32% por el genotipo, mientras que la interacción entre ambos fue baja (9%; Tabla 1).

El número de chalas fue similar ( $p>0,05$ ) entre parentales en ambas fechas (alrededor de 8; Tabla 1). La media de las RILs fue de 7 en ambas fechas, y varió de 5 a 11 en la fecha temprana y de 5 a 16 en la fecha tardía (Tabla 1). La variación entre genotipos para este carácter fue alta (25%; Tabla 1). La variación entre ambientes y la interacción genotipo x ambiente fue del 1 y 13% respectivamente (Tabla 1). El residual también fue elevado (61%; Tabla 1).

El largo de las chalas (expresado como los cm. de chala que sobrepasan la punta de la espiga), fue similar ( $p>0,05$ ) entre los parentales en ambas fechas (~ 8 cm; Tabla 1). La media de las RILs fue similar entre ambientes (6,2 y 7,2 en fecha temprana y tardía, respectivamente; Tabla 1), y varió de -2 a 14 y de -4 a 15 en la fecha temprana y tardía, respectivamente. El 39% de la variación en largo de chalas fue debida al genotipo, mientras que la variación dada por el ambiente y la interacción genotipo x ambiente fue baja (6 y 7% respectivamente; Tabla 1). El residual para este carácter fue del 47%.

El rendimiento fue superior en el parental 2 respecto al parental 1 en la fecha temprana (4.875 y 2.852 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente), aunque con diferencias no significativas ( $p=0,156$ ), mientras que fue similar entre padres en la fecha tardía (~2.200 kg ha<sup>-1</sup>; Tabla 1). La media de las RILs fue mayor en la fecha temprana (3.302 kg ha<sup>-1</sup> respecto a 2.153 kg ha<sup>-1</sup> en fecha tardía), y varió de 310 a 8.772 kg ha<sup>-1</sup> y de 0 a 8.407 kg ha<sup>-1</sup> en fecha temprana y tardía, respectivamente (Tabla 1). El 36% de la variación total de rendimiento se debió al genotipo, el 23% al ambiente y el 12% a la interacción (Tabla 1). El residual para rendimiento fue del 29%.

La mayoría de los caracteres mostraron una correlación positiva significativa entre ambientes, a excepción de la tasa de secado donde no hubo correlación (Tabla 2). La asociación mostró un  $r$  elevado para largo de chalas (0,98), tiempo a antesis (0,79), stay green (0,72) y rendimiento (0,67; Tabla 2). La correlación fue menor para número de chalas (0,37; Tabla 2).

El stay green mostró cierta asociación con la tasa de secado en ambas fechas ( $r=0,18$ ), aunque la misma fue positiva en fecha temprana y negativa en fecha tardía. En la fecha tardía el tiempo a antesis se relacionó negativamente con la tasa de desecación ( $r=-0,24$ ). La tasa de desecación estuvo negativamente relacionada con el largo de chalas ( $r=-0,26$ ; Tabla 2).

**Tabla 2.** Matriz de correlación de Pearson entre los BLUPs para los caracteres tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado (TS), stay green (SG), número de chalas (Nch), largo de chalas (Lch) y rendimiento (Rend) para las RILs en siembra temprana (Temp) y tardía (Tard). En fondo gris se indican las correlaciones para un mismo carácter entre ambientes. En negrita se indican las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ).

	TTA Tard	TS Temp	TS Tard	SG Temp	SG Tard	Nch Temp	Nch Tard	Lch Temp	Lch Tard	Rend Temp	Rend Tard
TTA Temp	<b>0,79</b>	-0,05		-0,16		-0,02		0,13		-0,16	
TTA Tard			<b>-0,24</b>		-0,04		-0,17		<b>0,31</b>		<b>-0,35</b>
TS Temp			<b>0,05</b>	<b>0,19</b>		-0,01		0,13		-0,06	
TS Tard					<b>-0,18</b>		0,05		<b>-0,26</b>		<b>0,30</b>
SG Temp					<b>0,72</b>	0,10		<b>0,38</b>		<b>-0,34</b>	
SG Tard							-0,09		<b>0,38</b>		<b>-0,48</b>
Nch Temp							<b>0,37</b>	-0,13		<b>0,19</b>	
Nch Tard									<b>-0,41</b>		<b>0,26</b>
Lch Temp									<b>0,98</b>	<b>-0,68</b>	
Lch Tard											<b>-0,57</b>
Rend Temp											<b>0,67</b>

### 3. Caracterización fenotípica de híbridos

Los híbridos derivados de la cruce de las RILs por un tester mostraron similar tiempo a antesis en ambas fechas (promedio de 996 y 956 °Cd<sup>-1</sup> en siembras tempranas y tardías respectivamente; Tabla 3). Los genotipos mostraron poca variación de dicho carácter, el tiempo térmico acumulado de siembra a antesis varió entre 958 y 1.076 °Cd en la fecha temprana y entre 897 y 1.014 °Cd en la fecha tardía. Estos valores corresponden alrededor de 5 y 4 días de diferencia entre el primero y último híbrido en fecha temprana y tardía, respectivamente. Esto determinó que los híbridos transcurrieran el periodo de llenado en similares condiciones ambientales dentro de cada fecha de siembra. Las diferencias entre genotipos explicaron el 26% de la variación (Tabla 3), mientras que el ambiente el 59% (Tabla 3). La variación dada por la interacción genotipo x ambiente fue baja (3%; Tabla 3).

La tasa de secado de granos tuvo valores medios superiores en fecha temprana (-0,21 % día<sup>-1</sup>; Tabla 3) que en fecha tardía (-0,11 % día<sup>-1</sup>; Tabla 3), variando de -0,30 a -0,11 % día<sup>-1</sup> en siembras tempranas (Tabla 3) y de -0,18 a -0,05 % día<sup>-1</sup> en tardía (Tabla 3). Las variaciones ambientales tuvieron un importante efecto sobre este carácter (89%; Tabla 3), mientras que las diferencias entre híbridos y su interacción con el ambiente tuvieron escasa importancia (<1% y 2 respectivamente; Tabla 3).

**Tabla 3.** Tiempo a antesis, tasa de secado de granos, stay green, número de chalas, largo de chalas y rendimiento para los híbridos derivados en dos ambientes (siembra temprana y tardía). Para cada atributo se muestra el % de la varianza total asociada a cada componente.

Ambiente	Genotipo	Tiempo a antesis (°Cd)	Tasa secado de grano (% día <sup>-1</sup> )	Stay green (1 a 9)	Número chalas (#)	Largo chalas (cm)	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )
Temprano	Híbridos Media	996	-0,21	2,9	7	2,4	12.956
	Híbridos Min	958	-0,30	1,0	5	0,0	6.492
	Híbridos Max	1.076	-0,11	5,0	9	7,0	18.670
Tardío	Híbridos Media	956	-0,11	5,0	8	2,5	12.867
	Híbridos Min	897	-0,18	2,0	6	0,0	6.502
	Híbridos Max	1.014	-0,05	8,0	12	7,0	17.865
<i>Varianzas (%)</i>							
	<i>Gen</i>	26	<1	11	4	28	13
	<i>Amb</i>	59	89	59	39	<1	<1
	<i>Gen*Amb</i>	3	2	5	2	<1	<1
	<i>Rep(Amb)</i>	<1	<1	6	11	3	<1
	<i>Residual</i>	12	8	18	44	69	87

El stay green tuvo valores medios superiores (plantas más secas) en la fecha de siembra tardía respecto a la temprana (5 y 2,9 respectivamente; Tabla 3) y varió de 1 a 5 en siembras tempranas (Tabla 3) y de 2 a 8 en siembras tardías (Tabla 3). La diferencia entre híbridos explicó un 11% de la variación (Tabla 3), mientras que el ambiente lo hizo en un 59% (Tabla 3), finalmente la magnitud de la interacción fue del 5% (Tabla 3).

El número de chalas tuvo valores medios similares en ambas fechas de siembra (7 y 8, temprano y tardío respectivamente; Tabla 3), variando de 5 a 9 en siembras tempranas (Tabla 3) y de 6 a 12 en tardía (Tabla 3). El efecto ambiente fue del 39% (Tabla 3). Los genotipos y su interacción con el ambiente tuvieron efectos menores (4 y 2 respectivamente; Tabla 3, siendo el residual para este atributo del 44% (Tabla 3).

El largo de las chalas en los híbridos tiene valores similares (mínimos de 0, medios ~2,5 y máximos de 7 cm) para ambas fechas (Tabla 3). La variación debido al ambiente fue baja (<1%; Tabla 3), estando las diferencias explicadas por la variación entre genotipos (28%). La interacción entre ambos factores es irrelevante (<1; Tabla 3). Se observa un importante efecto residual sobre este carácter (69%; Tabla 3).

El rendimiento medio de los híbridos en fecha temprana fue 12.956 kg ha<sup>-1</sup> (Tabla 3) y en tardía 12.867 kg ha<sup>-1</sup> (Tabla 3). Los rendimientos mínimos fueron 6.492 y 6.502 kg ha<sup>-1</sup> en siembras temprana y tardía respectivamente (Tabla 3), mientras que los máximos fueron 18.670 y 17.865 kg ha<sup>-1</sup> (Tabla 3). Las diferencias de rendimientos estuvieron explicadas principalmente por las diferencias entre genotipos (13%; Tabla 3), mientras que el ambiente

y las interacciones genotipo x ambiente fueron despreciables (<1%; Tabla 3). Es evidente el efecto residual observado (87%; Tabla 3).

La mayoría de los caracteres mostraron una correlación positiva significativa entre ambientes, a excepción de la tasa de secado y el número de chalas donde no hubo correlación (Tabla 4). La asociación mostró un r elevado para largo de chalas (0,97), tiempo a antesis (0,74) y stay green (0,50; Tabla 4). La correlación fue menor para rendimiento (0,22; Tabla 2).

El stay green mostró cierta asociación negativa con el tiempo térmico a antesis ( $r \sim -0,28$ ) y positiva con el largo de chalas ( $r \sim 0,26$ ) en ambas fechas. La tasa de secado se relacionó negativamente con el tiempo térmico a antesis en la fecha tardía ( $r = -0,22$ ) y con número de chalas en el mismo ambiente ( $r = -0,20$ ). El número de chalas, a su vez, se relacionó negativamente en fecha tardía con stay green ( $r = -0,23$ ) y con el largo de chalas ( $r = -0,35$ ).

**Tabla 4.** Matriz de correlación de Pearson entre los caracteres tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado (TS), stay green (SG), número de chalas (Nch), largo de chalas (Lch) y rendimiento (Rend) para los híbridos derivados en siembra temprana (Temp) y tardía (Tard). En fondo gris se indican las correlaciones para un mismo caracter entre ambientes. En negrita se indican las correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ).

	TTA Tard	TS Temp	TS Tard	SG Temp	SG Tard	Nch Temp	Nch Tard	Lch Temp	Lch Tard	Rend Temp	Rend Tard
TTA Temp	<b>0,74</b>	0,06		<b>-0,30</b>		0,06		0,14		-0,05	
TTA Tard			<b>-0,22</b>	<b>-0,27</b>		0,09		0,07		0,00	
TS Temp		<b>0,04</b>	-0,11			-0,04		0,06		-0,15	
TS Tard				0,13		<b>-0,20</b>		-0,03		-0,17	
SG Temp				<b>0,50</b>		0,02		<b>0,23</b>		0,05	
SG Tard						<b>-0,23</b>		<b>0,29</b>		0,09	
Nch Temp						<b>0,15</b>		0,01		-0,03	
Nch Tard								<b>-0,35</b>		0,10	
Lch Temp								<b>0,97</b>		<b>-0,30</b>	
Lch Tard											-0,09
Rend Temp											<b>0,22</b>

#### 4. Relación fenotípica entre líneas e híbridos derivados

Como se observa en la Tabla 5, el tester y las RILs mostraron similar ( $p > 0,05$ ) tiempo a antesis en ambas fechas (promedian de 1.133 a 1.095 °Cd<sup>-1</sup> en siembras tempranas y 1.081 a 1.051 °Cd<sup>-1</sup> en siembras tardías; Tabla 3). Los híbridos tuvieron valores medios inferiores a las líneas (996 y 956 °Cd<sup>-1</sup> en siembras tempranas y tardías respectivamente), demostrado por la heterosis negativa del caracter (-10%; Tabla 5). Éste posee una alta heredabilidad en sentido amplio (0,87; Tabla 5), y coeficiente de variación bajo (5,2%), explicado principalmente por las diferencias entre líneas e híbridos (tipo) en un 70% (Tabla

5), mientras que las diferencias dentro de líneas y dentro de híbridos fue baja (12%; Tabla 5), al igual que el efecto ambiental (13%; Tabla 5). Las interacciones del tipo y de los genotipos con el ambiente fueron prácticamente nulas (<1 y 2 respectivamente; Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores medios de: tiempo a antesis, tasa de secado de granos, stay green, número de chalas, largo de chalas y rendimiento para las 129 RILs, el tester y sus híbridos derivados en dos ambientes (siembra temprana y tardía). Para cada atributo se muestra el coeficiente de variación (CV), heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ), heterosis (HET) y % de la varianza total asociada a cada componente.

Ambiente	Genotipo	Tiempo a antesis (°Cd)	Tasa secado de grano (% día <sup>-1</sup> )	Stay green (1 a 9)	Número chalas (#)	Largo chalas (cm)	Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )
Temprano	RIL Media	1.095	-0,21	3,2	7	6,2	3.302
	Tester Media	1.133	-0,24	6,5	5	6,0	3.601
	Híbridos Media	996	-0,21	2,9	7	2,4	12.956
Tardío	RIL Media	1.051	-0,18	5,7	7	7,1	2.153
	Tester Media	1.081	-0,18	7,0	5	8,0	2.009
	Híbridos Media	956	-0,11	5,0	8	2,5	12.867
CV (%)		5,2	19,8	28,1	4,2	46,2	65,2
$H^2$		0,87	0,10	0,77	0,45	0,72	0,54
HET (%)		-10	-22	-31	15	-64	399
<i>Varianzas (%)</i>							
<i>Gen</i>		12	1	24	15	13	1
<i>Tipo</i>		70	<1	2	<1	66	93
<i>Amb</i>		13	35	49	4	<1	<1
<i>Gen*Amb</i>		2	2	8	5	1	<1
<i>Tipo*Amb</i>		<1	20	1	13	2	1
<i>Res</i>		3	42	15	61	18	4

La tasa de secado de granos mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el tester y las RILs en siembras tempranas (-0,24 y -0,21 % día<sup>-1</sup> respectivamente; Tabla 5), mientras que en siembras tardías la tasa fue similar (-0,18 % día<sup>-1</sup>; Tabla 5). Los híbridos tuvieron valores iguales a las RILs en siembras tempranas (-0,21% día<sup>-1</sup>; Tabla 5), mientras que en siembras tardías la tasa de secado de los híbridos fue inferior (-0,11; Tabla 5). La heterosis promedio del carácter es -22% (Tabla 5) y su heredabilidad en sentido amplio es baja (0,10; Tabla 5). El coeficiente de variación es de 19,8% (Tabla 5), debido principalmente al efecto ambiental y su interacción con el tipo (35 y 20% respectivamente; Tabla 5). El tipo *per se* no presentó gran variación (<1%; Tabla 5), al igual que el genotipo y la interacción del mismo con el ambiente (1 y 2% respectivamente; Tabla 5). Se observa una importante participación del residual en la variabilidad del carácter (42%; Tabla 5).

El stay green del tester fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al de las líneas en siembras tempranas (6,5 y 3,2 respectivamente; Tabla 5) y tardías (7 y 5,7 respectivamente;

Tabla 5). Los híbridos mostraron valores medios de 2,9 y 5 en siembras tempranas y tardías respectivamente (Tabla 5). Los valores de los híbridos inferiores a los de las RILs y tester se explican en parte por la heterosis negativa (-31%). El coeficiente de variación es de 28,1% (Tabla 5). Las principales diferencias dentro de este atributo se deben al efecto ambiental (49%; Tabla 5) y la variación entre genotipos dentro de tipo (24%; Tabla 5). El tipo y las interacciones con el ambiente son de menor efecto (Tabla 5).

El número de chalas del tester fue 5 en siembras tempranas y tardías (Tabla 5), mientras que las RILs tuvieron valores medios de 7 en ambas fechas (Tabla 5), siendo estas diferencias no significativas ( $p > 0,05$ ). Por su parte los híbridos presentaron una leve variación entre ambas fechas (7 y 8, temprano y tardío respectivamente; Tabla 5). La heterosis es positiva aunque su valor es bajo (15%; Tabla 5). La heredabilidad es media (0,45) y el CV es bajo (4,2%; Tabla 5).

El largo de chalas del tester fue 6 y 8 cm. en siembras tempranas y tardías respectivamente (Tabla 5), mientras que las RILs tuvieron valores de 6,2 y 7,1 cm. (Tabla 5). No hubo diferencias significativas entre tester y RILs en ninguna de las fechas de siembra. Los híbridos presentaron valores inferiores en ambas fechas (~2,5 cm.; Tabla 5), demostrado por la heterosis negativa del carácter (-64%). La heredabilidad fue alta (0,72) y el CV es elevado (46,2%), explicado principalmente por el efecto tipo en un 66%, seguido por la variación entre genotipos dentro del tipo (13%; Tabla 5), mientras que el ambiente y sus interacciones tuvieron escaso efecto (Tabla 5).

El rendimiento de las líneas fue similar ( $p > 0,05$ ) al tester en ambas fechas de siembra (Tabla 5). Los híbridos tuvieron rendimientos superiores a las líneas en ambas fechas (12.956 y 12.867 kg ha<sup>-1</sup>, temprano y tardío respectivamente; Tabla 5), evidenciado por la alta heterosis del carácter (399%; Tabla 5). La heredabilidad es media (0,54; Tabla 5) y el CV es alto (65,2), explicado en un 93% por la diferencia entre líneas e híbridos (tipo) (Tabla 5).

Varios caracteres mostraron una correlación positiva significativa entre tipos (líneas e híbridos) dentro del mismo ambiente, a excepción de la tasa de secado y el rendimiento en los cuales no se encontró asociación (Tabla 6). Se observó un  $r$  elevado para largo de chalas (~0,60) y tiempo a antesis (~0,50). La correlación fue menor para número de chalas (~0,30) y stay green (~0,25; Tabla 6).

También se observaron correlaciones entre los tipos para los diferentes ambientes. El tiempo térmico a antesis de híbridos en siembra temprana se asoció positivamente con el de líneas en siembra tardía. El stay green de líneas en fecha temprana se relacionó positivamente con el de híbridos en fecha tardía ( $r=0,30$ ), y el de híbridos en fecha temprana

con el de líneas en tardía ( $r=0,24$ ). El número de chalas de líneas en fecha temprana se asoció en forma positiva con el de híbridos en tardía ( $r=0,31$ ). El largo de chalas tuvo correlación positiva entre líneas en fecha temprana e híbridos en tardía ( $r=0,56$ ) y entre híbridos en temprana y líneas en fecha tardía ( $r=0,58$ ; Tabla 6).

La tasa de secado de las líneas en fecha temprana se relacionó negativamente con el tiempo térmico a antesis de los híbridos en ambas fechas ( $r=-0,20$ ). Este último se relacionó negativamente en todas la combinaciones de tipo y ambiente con el stay green ( $r=-0,22$ ). El stay green de las líneas en fecha temprana se asoció en forma positiva con la tasa de secado de los híbridos en fecha tardía ( $r=0,22$ ). Por último el largo de chalas tuvo asociaciones negativas con el número y positivas con el stay green (Tabla 6).



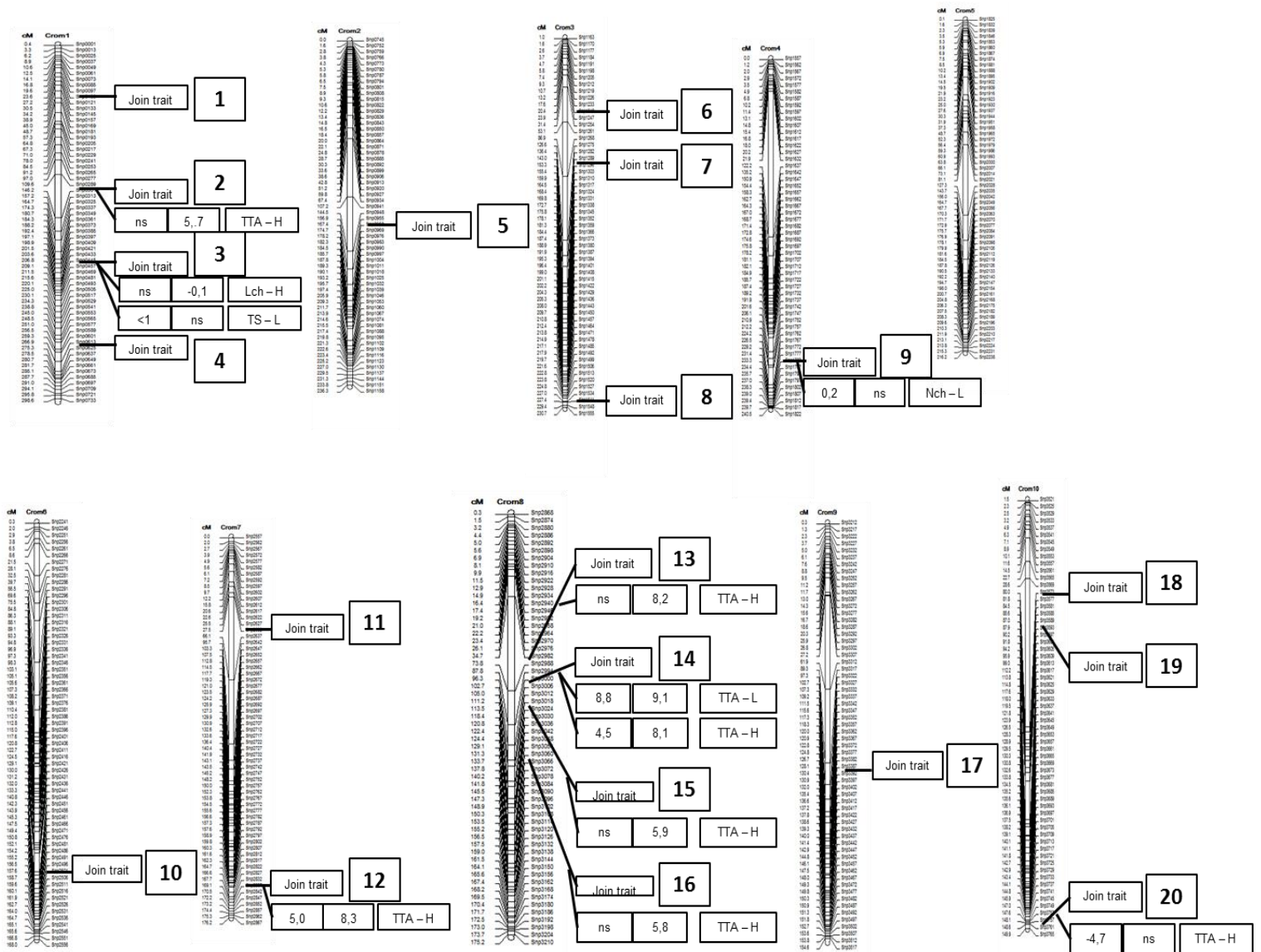
### 5. Análisis de QTLs conjuntos

Para este análisis se realizó una regresión utilizando mapeo por intervalos compuestos (CIM), considerando las correlaciones entre atributos y ambientes para cada tipo.

Se identificaron 20 QTLs conjuntos (Join trait) significativos (LOD>12), distribuidos a lo largo del genoma completo a excepción del cromosoma 5 en donde no se identificaron QTLs (Fig. 4). En el cromosomas 1 se encontraron cuatro QTLs conjuntos (1, 2, 3 y 4), en el cromosoma 2 un QTL conjunto (5), en el cromosoma 3 tres QTLs conjuntos (6, 7 y 8), en el cromosoma 4 uno (9), en el cromosoma 6 uno (10), en el cromosoma 7 dos (11 y 12), en el 8 se encontraron cuatro QTLs conjuntos (13, 14, 15 y 16), en el cromosoma 9 un QTL (17) y finalmente en el cromosoma 10 se encontraron tres QTLs conjuntos (18, 19 y 20; Fig. 4).

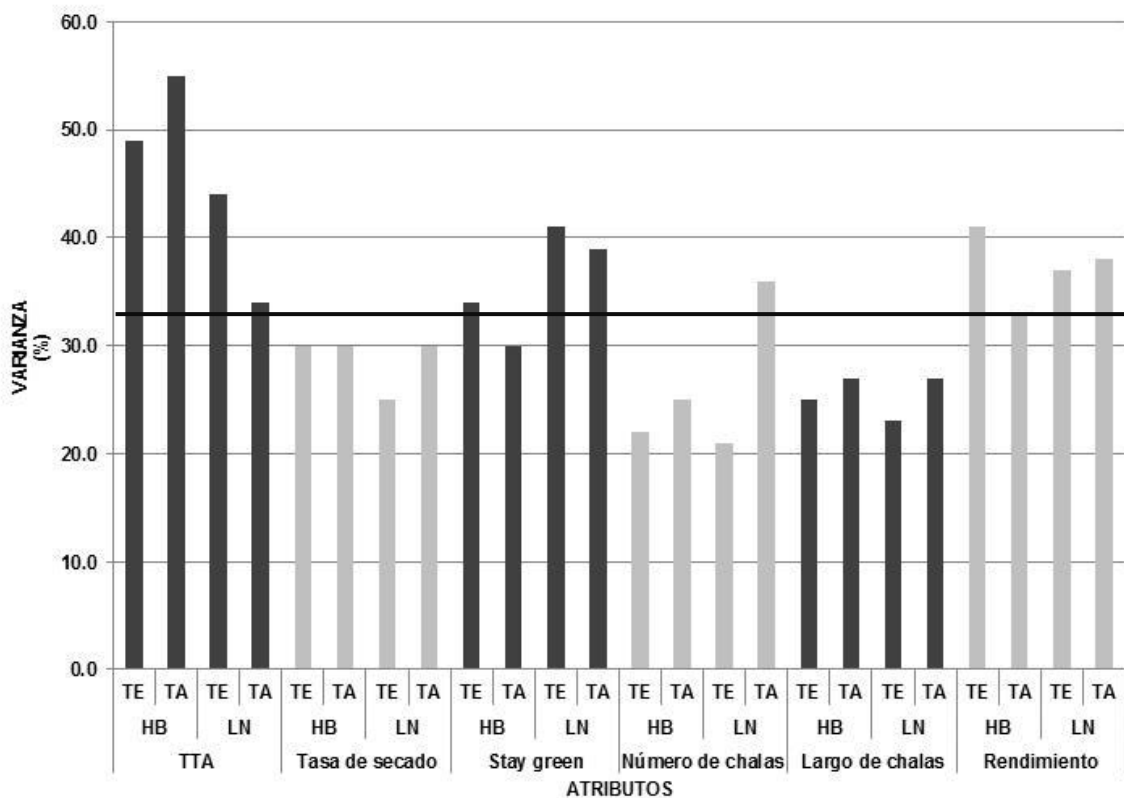
**Tabla 7.** Ubicación en los cromosomas (Crom) y posición (cM) de los 20 QTLs conjuntos (Join Trait) identificados.

QTL Conjunto	Crom	Posición (cM)
1	1	29,5
2		93,4
3		192,0
4		220,8
5	2	161,0
6	3	40,7
7		146,6
8		236,1
9	4	204,8
10	6	157,6
11	7	49,0
12		168,1
13	8	26,9
14	8	67,6
15	8	90,9
16		116,0
17	9	129,3
18	10	23,9
19		67,9
20		235,8



**Fig. 4.** Ubicación en los cromosomas de los QTLs detectados. QTLs conjuntos (Join trait) y atributos individuales, tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado (TS), largo de chalas (Lch) y número de chalas (Lch) para los tipo línea (L) e híbrido (H). Los dos bloques pertenecientes a los atributos individuales muestran el efecto aditivo de los QTLs en cada ambiente (siembra temprana a la izquierda y tardía a la derecha). El efecto aditivo corresponde al alelo del parental 2.

Los QTLs conjuntos identificados explicaron porcentajes elevados de la varianza fenotípica de cada combinación atributo-ambiente-tipo, desde 21 a 55%, en promedio 33% (Fig. 5). El tiempo térmico a antesis estuvo explicado en un 45% en promedio por los QTLs detectados, siendo un ~39% para líneas y un ~52% para los híbridos. La tasa de secado fue explicada por el modelo en un 29% en promedio, siendo ~27 y ~30% para líneas e híbridos respectivamente. El stay green estuvo explicado en un ~36% de su varianza fenotípica, ~40% en líneas y ~32% en híbridos. En el número de chalas fue en promedio un 26%, siendo ~28 y ~23% para líneas e híbridos respectivamente. El largo de las chalas estuvo explicado en un ~25% de su variación fenotípica, ~25% en líneas y ~26% en híbridos. Por último el rendimiento fue explicado por el modelo en un 37% en promedio, siendo ~37% en líneas y ~37% en híbridos (Fig. 5).



**Fig. 5.** Proporción de la varianza total explicada por el modelo multi-atributo multi-ambiente multi-tipo, para atributos: tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado, stay green, número de chalas, largo de chalas y rendimiento. Ambiente: siembra temprana (TE) y siembra tardía (TA). Tipo: líneas (LN) e híbridos (HB).

## 6. Análisis de QTLs individuales

Dentro de cada QTL conjunto detectado se observó qué atributo fue significativo. Para identificar estos QTLs individuales se utilizó un valor  $LOD > 2,5$  para el carácter tasa de secado de grano y  $LOD > 3$  para el resto (largo y número de chalas, stay green, tiempo térmico a antesis y rendimiento).

Como se observa en la Tabla 8 se encontraron atributos que co-localizaron en nueve de los veinte QTLs conjunto identificados. Los QTLs significativos correspondieron a los caracteres tiempo térmico a antesis, tasa de secado y largo de chalas. La tasa de secado de las líneas en fecha temprana co-localizó con el largo de chalas de híbridos en fecha tardía dentro de un QTL conjunto del cromosoma 1 (QTL conjunto 3). En el cromosoma 4 se encontró el número de chalas de líneas en fecha temprana en el QTL conjunto 9. El resto de las co-localizaciones corresponden al carácter tiempo térmico a antesis en diferentes combinaciones de tipo-fecha de siembra. En la fecha temprana se ubicó el TTA de las líneas en el cromosoma 8 (QTL conjunto 14), y TTA de los híbridos en los cromosomas 7, 8 y 10 (QTLs conjuntos 12, 14 y 20 respectivamente). En fecha tardía se encuentra el mismo QTL para las líneas en el cromosoma 8 (QTL conjunto 14), mientras que en los híbridos se repiten los QTLs conjuntos 12 y 14, y se agregan nuevos en los cromosomas 1 y 8 (QTLs conjuntos 2, 13, 15 y 16). Se puede observar que en el QTL conjunto 14 (cromosoma 8, posición 67,6 cM) se encuentran co-localizando el TTA de líneas e híbridos en ambas fechas de siembra y en el QTL conjunto 12 (cromosoma 7, posición 168,1 cM) co-localizan el TTA sólo de híbridos también en las dos fechas (Tabla 8). Los efectos aditivos corresponden a los efectos alelo del Parental 2 sobre la media de la población, se observan valores positivos para la mayoría de los QTLs detectados, salvo para el largo de chalas que tiene un valor de -0,1 (cromosoma 1) y el tiempo térmico a antesis de híbridos en fecha temprana en el cromosoma 10 (-4,7; Tabla 8).

**Tabla 8.** Atributos individuales co-localizados con los QTLs conjuntos (Join trait). Atributos: tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado, número de chalas y largo de chalas. Ambientes: siembra temprana y tardía. Tipo: líneas e híbridos. Efecto aditivo y LOD de cada combinación atributo-ambiente-tipo.

QTL Conjunto	Análisis de QTL	Atributo	Tipo	r <sup>2</sup>	Crom	Posición (cM)	Efecto Aditivo	LOD	
14	Siembra temprana	TTA	Línea	0,34	8	67,6	8,8	3,0	
12		TTA	Híbrido	0,55	7	168,1	5,0	4,0	
14		TTA			8	67,6	4,5	3,1	
20		TTA				10	235,8	-4,7	3,5
3		Tasa de secado	Línea	0,30	1	192,0	<1	2,6	
9		Num de chalas		0,36	4	204,8	0,2	3,1	
14	Siembra tardía	TTA	Línea	0,44	8	67,6	9,2	3,0	
2		TTA	Híbrido	0,49	1	93,4	5,7	3,2	
12		TTA			7	168,1	8,3	9,0	
13		TTA			8	26,9	8,2	8,6	
14		TTA			8	67,6	8,2	9,3	
15		TTA			8	90,9	5,9	4,2	
16		TTA			8	116,0	5,9	4,1	
3		Largo de chalas		0,25	1	192,0	-0,1	3,2	

## DISCUSIÓN

El secado de los granos post madurez fisiológica es altamente dependiente de variables climáticas relacionadas con la humedad relativa del aire y la demanda atmosférica (Schmidt y Hallauer, 1996). Los resultados de la presente tesis son consistentes con esto, mostrando que el ambiente (fecha) explicó una importante proporción de la variación en la tasa de secado tanto en líneas como en híbridos. La tasa de secado fue menor (valores menos negativos) en la fecha de siembra más tardía comparado con la fecha temprana, lo que va de la mano con los menores valores de déficit de presión de vapor y evapotranspiración potencial durante el secado en la fecha tardía respecto a la fecha temprana. Los resultados muestran que el ambiente siempre fue más importante que el genotipo en determinar la tasa de secado post madurez fisiológica.

Además del ambiente, el genotipo también tiene influencia en el secado a través de diferentes características como lo ajustado de las chalas, el peso hectolítrico, y el espesor y permeabilidad del pericarpio del grano (Troyer y Amborse, 1971, Hicks et al., 1976, Cross, 1985; Crane et al., 1959). Sin embargo, la población bajo estudio en la presente tesis mostró poca variación genotípica en la tasa de desecación. La población de RILs evidenció un alto error mientras que en los híbridos fue muy importante el efecto ambiental. Todo esto determinó una baja heredabilidad del carácter, en contraposición con lo encontrado en Sala et al. (2006), donde la heredabilidad estimada para la tasa de secado fue alta. A diferencia de lo observado en Sala et al. (2006), esto puede deberse a que las líneas padres en la población usada en la presente tesis tampoco mostraron importante variación en tasa de secado. Los padres tampoco mostraron diferencias consistentes en otros atributos genotípicos potenciales relacionados con la tasa de secado como el stay green, largo de chalas y número de chalas, lo que puede impactar en los resultados obtenidos. Esto demuestra la importancia en la elección de los padres de la población bajo estudio, particularmente cuando se trabaja con atributos de difícil determinación fenotípica o que en su determinación tienen un alto error. Tampoco se observó asociación entre la tasa de desecación en líneas o híbridos entre ambientes, lo que podría también estar ligado a la poca variación del carácter.

El resto de los atributos evaluados (tiempo a antesis, stay green, número de chalas y largo de chalas) sí mostraron mayor variación entre genotipos, siendo esta variación en general más importante en líneas que en híbridos. La heredabilidad de estos caracteres también fue mayor a la tasa de desecación, siendo menor para aquellas variables con mayor error en su determinación, como por ejemplo el número de chalas. En concordancia con

estos resultados también se observó asociación entre ambientes para todos los atributos tanto en líneas como en híbridos. Una alta heredabilidad de estos caracteres también ha sido reportada previamente (tiempo a antesis, Kinfe y Tsehaye, 2015; stay green, Bekavac et al., 2007; largo de chalas, Cui et al., 2016).

Al analizar la asociación entre la desecación y el resto de los atributos medidos, resulta interesante destacar que tanto en líneas como en híbridos se observó mayor asociación entre determinados atributos y la desecación en la fecha de siembra tardía, lo que sugiere que ciertos caracteres del genotipo serían relevantes ante condiciones ambientales que limiten la desecación. Por ejemplo, la relación negativa entre desecación y tiempo a antesis en la fecha tardía sugiere que ciclos más largos tienen mayor desecación. Esto va de la mano con la marcha del déficit de presión de vapor, que mostró valores más favorables para el secado cuando el mismo fue más tardío. Asimismo, en la fecha tardía también se observó una asociación negativa entre desecación y stay green, lo que significa que plantas más secas favorecen la desecación. El número de chalas se asoció negativamente con la desecación en híbridos, a diferencia de lo encontrado por Nielsen (2000) y Thomison (2004), aunque esto puede estar ligado al trade-off detectado entre número y largo de chalas. Otra relación no esperada fue la relación negativa tanto en líneas como en híbridos entre el largo de chalas y la desecación en la fecha tardía. Se concluye que de todos los atributos del genotipo medidos, la fenología y el stay green serían importantes en la determinación de la tasa de secado. Como fuera dicho previamente, estos atributos del genotipo serían relevantes ante condiciones ambientales que limiten la desecación.

Para el mejoramiento es de vital importancia que caracteres estudiados en las líneas se expresen de igual manera en los híbridos derivados. El comportamiento de líneas endocriadas es un mal predictor de comportamiento de los híbridos para ciertos caracteres como el rendimiento (Bekavac et al., 2008; Hallauer and Carena, 2009; Hallauer and Miranda, 1988), pero un buen predictor para peso de grano (Alvarez Prado et al., 2013b). Los resultados de la presente tesis muestran que independientemente del ambiente, líneas e híbridos evidencian cierta asociación para atributos como tiempo a antesis, stay green, número de chalas y largo de chalas, pero no para la tasa de desecación. Sala et al. (2012) encontraron alta correlación entre líneas e híbridos para humedad de grano a cosecha, pero esta asociación para tasa de secado no había sido explorada. Nuevamente, esto puede deberse a la poca variación entre genotipos explorada. A pesar de esto, se concluye que en esta población, lo que se observó en la línea no sería extrapolable al híbrido. En definitiva esto indicaría que los resultados podrían favorecer la producción de semilla a través de un

mejor secado de las líneas, pero no impactaría al nivel del productor mejorando el secado del híbrido.

Muchos de los caracteres de importancia agronómica, como el rendimiento, el número de granos o el secado, son caracteres cuantitativos complejos afectados por muchos genes y el ambiente, y que muestran interacciones entre los genes y el ambiente. Pocos investigadores lograron demostrar que la tasa de secado de granos está controlada por efectos aditivos en mayor medida que los no aditivos, teniendo alta heredabilidad y siendo heredado en forma estable (Purdy y Crane, 1967; Cai 1995). En la presente tesis se pone en evidencia una heredabilidad muy baja para la tasa de secado. Esto está asociado a varios factores, en primer lugar la escasa variabilidad genotípica presentada por el carácter, 2% y 1% en líneas e híbridos respectivamente, la elevada influencia ambiental, y el error asociado a la determinación de la tasa de secado, tanto en las mediciones de humedad de grano a campo, como en las estimaciones de la tasa de secado a través de regresiones lineales. De todas formas, a través del mapeo por intervalos compuestos, se identificó un QTL controlando la tasa de secado de los granos de las líneas en fechas tempranas, ubicado en el cromosoma 1. Esto surge como un dato relevante para el mejoramiento del cultivo de maíz, aunque se deben reconocer las limitaciones previamente mencionadas.

Los QTL para tasa de secado encontrados en trabajos anteriores (Sala et al., 2006) fueron ubicados en los grupos de ligamiento 1, 5 y 8, donde el correspondiente al cromosoma 1 se ubica en una posición diferente al encontrado en esta tesis. Por otro lado, Wang et al. (2012) encontraron 10 QTL distribuidos en los cromosomas 2, 3, 6 y 8. Estos QTL no parecen ser relevantes para el germoplasma descrito y estudiado en la presente tesis.

El resto de los caracteres estudiados (tiempo a antesis, número de chalas, largo de chalas y rendimiento) fueron incluidos en el análisis de QTL a fin de determinar su asociación con la tasa de secado, aunque los resultados son pocos concluyentes. Los resultados del análisis muestran QTL detectados para tiempo a antesis, pero ninguno co-localiza con el QTL de tasa de desecación, como podría esperarse en base a los datos fenotípicos. Tal como lo demostraron Chardon et al. (2004), existen varias regiones del genoma que regulan el tiempo a antesis. El QTL detectado para tasa de desecación en líneas co-localizó con un QTL para largo de chalas en híbridos, pero esta asociación tampoco fue observada con los datos fenotípicos.

Se detectaron posiciones del genoma que podrían estar explicando la variación fenotípica observada en largo y número de chalas. El largo de chalas fue ubicado en un QTL del cromosoma 1, mientras que el número de chalas en el cromosoma 4, en concordancia

con un QTL previamente reportado por Cui et al. (2016), quienes detectaron 5 QTL para el número de chalas ubicados en los cromosomas 4, 5, 9 y 10.

## CONCLUSIONES

La población de RILs no mostró la variación fenotípica esperada para tasa de secado, lo que se vió además limitado por la dificultad de determinación del atributo. La poca variación en este atributo y otros de interés entre los padres pudo haber contribuido a limitar la segregación en la población, lo que demuestra la importancia en la elección de padres en las poblaciones de mapeo, particularmente para rasgos de difícil determinación como el considerado en la presente tesis.

El efecto ambiental sobre la tasa de secado fue muy importante, independientemente del tipo línea o híbrido, y el efecto del genotipo tendió a ser más importante cuando las condiciones ambientales limitaron la desecación de los granos, como una fecha de siembra tardía. La fenología y el stay green de planta parecen ser atributos importantes a la hora seleccionar por líneas de más rápida desecación.

No se pudo establecer una relación entre las líneas y sus híbridos derivados para la tasa de secado de granos. La relativa poca variación genotípica detectada, el alto impacto del ambiente y dificultades en la determinación pueden explicar este resultado. Se concluye que lo observado en las líneas para desecación difícilmente sea extrapolable al híbrido derivado, a pesar de que otros atributos pueden estar asociados.

Se encontraron QTLs para cuatro de los seis caracteres estudiados (tiempo a antesis, tasa de secado, largo y número de chalas). Sólo para el atributo tiempo a antesis se observó mayor estabilidad a través de tipo (línea e híbrido) y de los ambientes, en concordancia con la mayor heredabilidad del carácter. Para la tasa de secado y largo y número de chalas, los QTL detectados no fueron estables a través de tipo y ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Prado S, Lopez C, Gambín BL, Abertondo V, Borrás L. 2013a. Dissecting the genetic bases of physiological processes determining maize kernel weight using IBM Syn4 population (B73xMo17). *Field Crops Research* 145:33-43.
- Alvarez Prado S, Gambín BL, Novoa AD, Foster D, Senior ML, Zinselmeier C, Otegui ME, Borrás L. 2013b. Correlations between parental inbred lines and derived hybrid performance for grain filling traits in maize. *Crop Science* 53:1636-1645.
- Andrade FH, Vega CR, Uhart SA, Cirilo AG, Cantarero M, Valentinuz OR. 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Science* 39:453-459.
- Asins MJ. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121:281-291.
- Austin DF, Lee M, Veldboom LR, Hallauer AR. 2000. Genetic mapping in maize hybrid progeny across testers and generations: grain yield and grain moisture. *Crop Science* 40:30-39.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67:1-48.
- Beavis WD, Smith OS, Grant D, Fincher R. 1994. Identification of Quantitative Trait Loci using a small sample of topcrossed and F4 progeny from maize. *Crop Science* 34:882-896.
- Bekavac G, Purar B, Stojakovic M, Jockovic DJ, Ivanovic M, Nastasic A. 2007. Genetic Analysis of Stay-Green Trait in Broad-Based Maize Populations. *Cereal Research Communications* 35:31-41.
- Bekavac G, Purar B, Jockovic D. 2008. Relationships between line per se and testcross performance for agronomic traits in two broad-based populations of maize. *Euphytica* 162:363-369.
- Bernardo R. 2008. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the Last 20 Years. *Crop Science* 48:1649-1664.
- Bert FE, Satorre EH. 2012. Sistemas de Producción de Maíz: Maíz Temprano y tardío. *Revista Técnica en SD – AAPRESID: Maíz*. Pg. 19-23.
- Bewley JD, Black M. 1985. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum, New York.
- Borevitz JO, Maloof JN, Lutes J, Dabi T, Redfern JL, Trainer GT, Werner JD, Asami T, Berry CC, 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 ME. 2006. Predicting maize kernel sink capacity early in development. *Field Crops Research* 95:223-233.
- Borrás L, Westgate ME, Otegui ME. 2003. Control of kernel weight and kernel water relations by post-flowering source-sink ratio in maize. *Annals of Botany* 91:857–867.
- Brocklehurst PA. 1977. Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* 266:348–34.
- Broman KW, Sen S, Wu H, Churchill GA. 2003. R/qt1: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889-890.
- Capitano R, Gentinetta E, Motto M. 1983. Grain weight and its components in maize inbred lines. *Maydica* 28:365-379.
- Cai RS. 1995. Progress on maize grain moisture. *Foreign Agriculture Crop* 3:53-54.
- Chardon F, Virlon B, Moreau L, Falque M, Joets J, Decousset L, Murigneux A, Charcosset A. 2004. Genetic Architecture of Flowering Time in Maize As Inferred From Quantitative Trait Loci Meta-analysis and Synteny Conservation With the Rice Genome. *Genetics* 168:2169-2185.
- Cirilo AG, Andrade FH. 1994a. Sowing date and maize productivity: I. Crop growth and dry matter partitioning. *Crop Science* 34:1039-1043.
- Cirilo AG, Andrade FH. 1994b. Sowing date and maize productivity: II. Kernel number determination. *Crop Science* 34:1044-1046.
- Collard BCY, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- Crane PL, Miles SR, Newman JE. 1959. Factors associated with varietal differences in rate of field drying in corn. *Agronomy Journal* 51:318-320.
- Cross HZ. 1985. A selection procedure for ear drying-rates in maize. *Euphytica* 34:409-418.
- Cui Z, Luo J, Qi C, Ruan Y, Li J, Zhang A, Yang X, He Y. 2016. Genome-wide association study (GWAS) reveals the genetic architecture of four husk traits in maize. *BMC Genomics* 17:946.
- D'Andrea KE, Otegui ME, Cirilo AG, Eyérabide GH. 2013. Parent-progeny relationships between maize inbreds and hybrids: Analysis of grain yield and its determinants for contrasting soil nitrogen conditions. *Crop Science* 53:2147-2151.
- Dijak M, Modarres AM, Hamilton RI, Dwyer LM, Stewart DW, Mather DE, Smith DL. 1999. Leafy reduced- stature maize hybrids for short- season environments. *Crop Science* 39:1106-1110.
- Doggett, H. *Sorghum*. 2nd edn. London, New York: Longman, published by Wiley, 1988.

- Dunn OJ. 1961. Multiple Comparisons Among Means. *Journal of the American Statistical Association* 56:52-64.
- Egli DB, Guffy RD, Meckel LW, Leggett JE. 1985. The effect of source-sink alterations on soybean seed growth. *Annals of Botany* 55:395–402.
- Egli DB, TeKrony DM. 1997. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. *Seed Science Research* 7:3–11.
- FAOSTAT, Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistics. 2017. <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Gambin BL, Borrás L. 2005. Sorghum kernel weight: growth patterns from different positions within the panicle. *Crop Science* 45:553–561.
- Gambín BL, Borrás L, Otegui ME. 2007. Kernel water relations and duration of grain filling in maize temperate hybrids. *Field Crops Research* 101:1-9.
- Gambín BL, Borrás L. 2014. Análisis de la red de maíz tardío AAPRESID. *Revista AAPRESID Maíz*.
- Gambin BL, Coyos T, Di Mauro G, Borrás L, Garibaldi L. 2016. Exploring genotype, management, and environmental variables influencing grain yield of late-sown maize in central Argentina. *Agricultural Systems* 146:11-19.
- Ganal MW, Durstewitz G, Polley A. 2013. A Large Maize (*Zea mays* L.) SNP Genotyping Array: Development and Germplasm Genotyping, and Genetic Mapping to Compare with the B73 Reference Genome. *PLoS ONE* 6 (12): e28334.
- Hackett PB. 2002. Genetic engineering: What are we fearing? *Transgenic Research* 11:97–99.
- Hallauer AR, Carena MJ, Miranda JB. 2010. *Quantitative genetics in maize breeding*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer, New York.
- Hallauer AR, Carena MJ. 2009. Maize breeding. In: Carena MJ (ed) *Cereals*. Springer, New York. Pp. 3-98.
- Hallauer AR and Miranda JB. 1988. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*, 2<sup>nd</sup> edition, Iowa State University Press, Ames.
- Hammer GL, Chapman S, van Oosterom E, Podlich DW. 2005. Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 56:947–960.
- Hammer G, Cooper M, Tardieu F, Welch S, Walsh B, van Eeuwijk F, Chapman S, Podlich, D. 2006. Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. *Trends in Plant Science* 11:587-593.

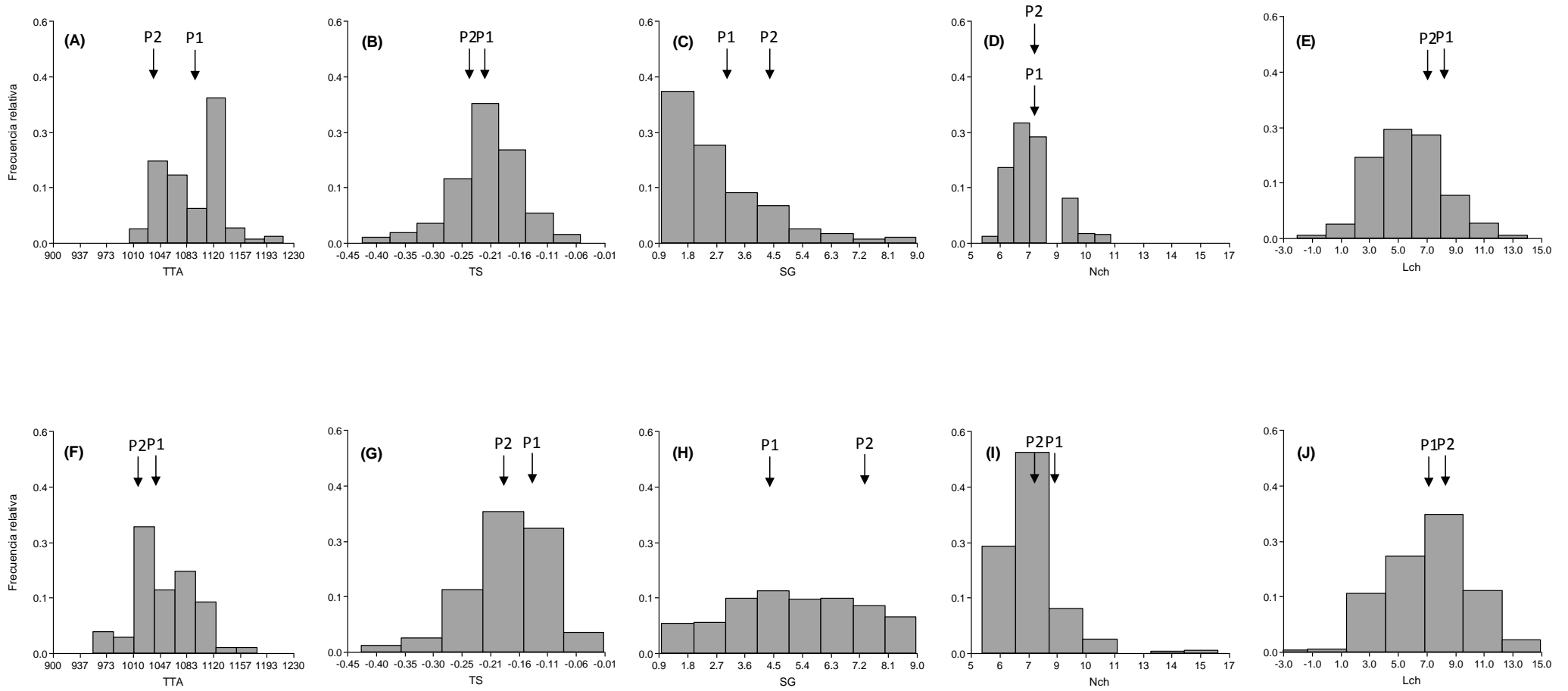
- Hargreaves GH, Samani ZA. 1985. Reference crop evapotranspiration from temperature. *Applied Engineering in Agriculture* 1:96-99.
- Hicks DR, Geadelmann JL, Peterson RH. 1976. Drying rates of frosted maturing maize. *Agronomy Journal* 68:452-455.
- Holland JB. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10:156–161.
- Hunter RB, Mortimore G, Gerrish EE, Kannenberg LW. 1979. Field drying of flint and dent endosperm maize. *Crop Science* 19:401-402.
- Jansen RC. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211.
- Jiang C, Zeng ZB. 1995. Multiple trait analysis of genetics mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127.
- Jones RJ, Schreiber BMN, Roessler JA. 1996. Kernel sink capacity in maize: Genotypic and maternal regulation. *Crop Science* 36:301-306.
- Kang MS, Zuber MS, Horrocks RD. 1978. An electronic probe for estimating ear moisture content of maize. *Crop Science* 18:1083-1084.
- Kao C, Zeng ZB, Teasdale RD. 1999. Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. *Genetics* 152:1203-1216.
- Kearsey MJ, Pooni HS. 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall, London.
- Kinfe H, Tsehaye Y. 2015. Studies of Heritability, Genetic Parameters, Correlation and Path Coefficient in Elite Maize Hybrids. *Academic Research Journals* 10:296-303.
- Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- Maddoni GA. 2012. Analysis of the climatic constraints to maize production in the current agricultural region of Argentina-a probabilistic approach. *Theoretical and Applied Climatology* 107:325-345.
- Malosetti M, Ribaut JM, Vargas M, Crossa J, van Eeuwijk FA. 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 AE, Utz HF, Schön CC. 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.
- Messina CD, Hammer GL, Dong Z, Podlich D, Cooper M. 2009. Modelling crop improvement in a G\*E\*M framework via gene-trait-phenotype relationships. In: Sadras,

- V., Calderini, D., eds. Crop physiology: interfacing with genetic improvement and agronomy. The Netherlands: Elsevier 235-265.
- Milhaljevic RC, Schön C, Utz HF, Melchinger AE. 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.
- Monteith JL. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 281:277-294.
- Murray FW. 1967. On the computation of saturation vapor pressure. *Journal of Applied Meteorology and Climatology* 6:203-204.
- Nielsen RL. 2000. Field Drydown of Mature Corn Grain. Purdue University. <http://www.kingcorn.org/news/timeless/GrainDrying.html>
- Ober ES, Setter TL, Madison JT, Thompson JF, Shapiro PS. 1991. Influence of water deficit on maize endosperm development. Enzyme activities and RNA transcripts of starch and zein synthesis, abscisic acid, and cell division. *Plant Physiology* 97:154-164.
- Otegui ME, Mercu JL, Menéndez FJ. 2002. Estrategias de manejo para la producción de maíz tardío y de segunda. En: E.H. Satorre (Ed.), *Guía Dekalb del cultivo de Maíz*. ISBN 987-20358-0-6. Pp. 171-184.
- Otegui ME, Petruzi D, Ruiz RA, Dodds PE. 1992. Actas V Congreso Nacional de Maíz y II Reunión Sudamericana de Maiceros. Pergamino, Argentina. II: 67-75.
- Purdy JL, Crane PL. 1967. Inheritance of drying rate in mature corn (*Zea mays* L.). *Crop Science* 7:294-297.
- R Development Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>
- Radushev D. 2007. Graph Pad Prism Version 5.0. Graph Pad Software, Inc.
- Reddy VM, Daynard TB. 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 ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology* 131:664-675.
- Ritchie SW, Hanway JJ. 1982. How a corn plant develops. Iowa State University. Special Report 48.
- Sadras VO, Slafer GA. 2012. Environmental modulation of yield components in cereals: Heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. *Field Crop Research* 127:215-224.

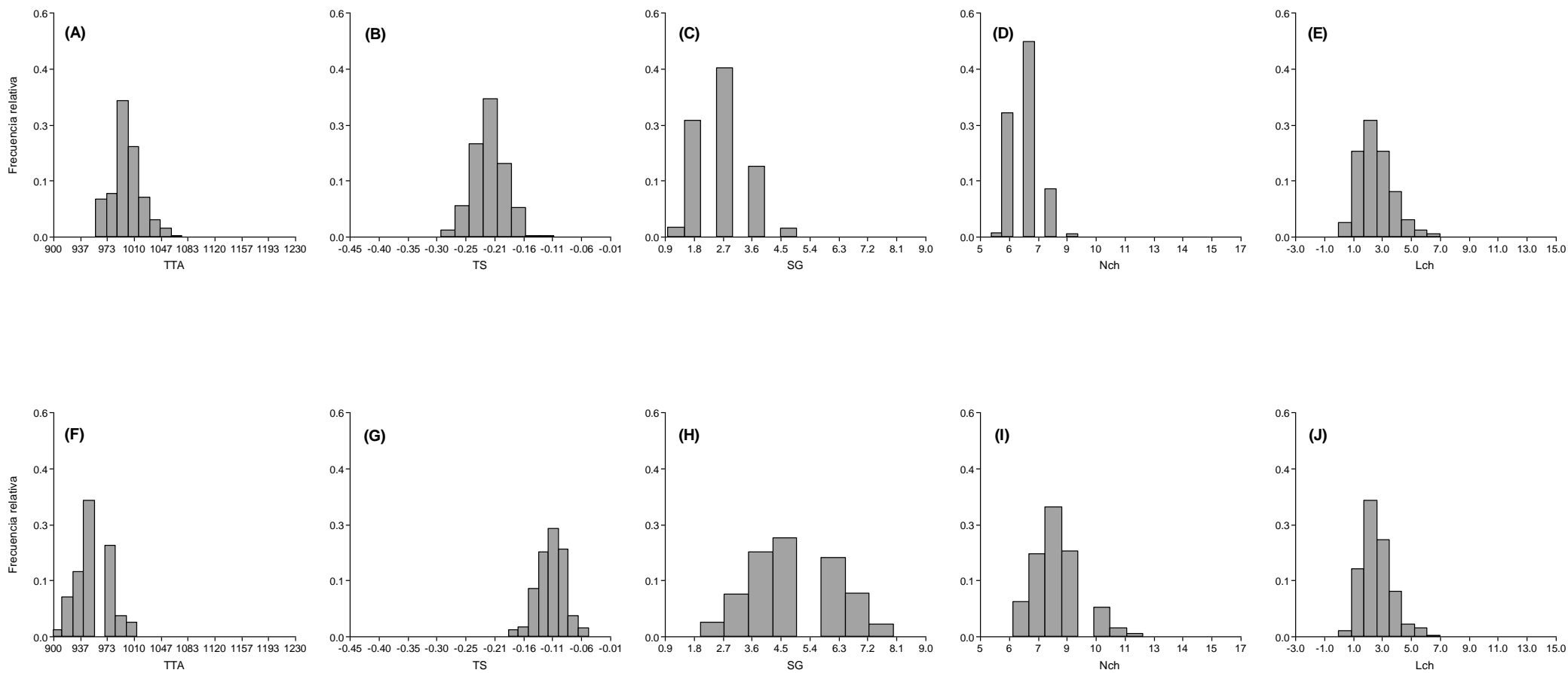
- Saini HS, Westgate ME. 2000. Reproductive development in grain crops during drought. In Spartes DL, (ed) *Advances in Agronomy* Vol. 68. Academic Press, San Diego. Pp. 59-96.
- Sala RG, Andrade FH, Camadro EL, Cerono JC. 2006. Quantitative trait loci for grain moisture at harvest and field grain drying rate in maize (*Zea mays*, L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:462-471.
- Sala RG, Andrade FH, Cerono JC. 2012. Quantitative trait loci associated with grain moisture at harvest for line per se and testcross performance in maize: a meta-analysis. *Euphytica* 158:429-440.
- Schmidt JL, Hallauer AR. 1966. Estimating harvest date of corn in the field. *Crop Science* 6:227-231.
- Smalley MD, Fehr WR, Cianzio SR, Han F, Sebastian SA. 2004. Quantitative trait loci for soybean seed yield in elite and plant introduction germplasm. *Crop Science* 44:436-442.
- Soil Survey Staff. 2010. *Keys to soil taxonomy*. 11th edn (USDA/NRCS: Washington, DC).
- Spagnolli F, Mace E, Jordan D, Borrás L, Gambín BL. 2016. Quantitative trait loci of plant attributes related to sorghum grain number determination. *Crop Science* 56:3046-3054.
- Swank JC, Egli DB, Pfeiffer TW. 1987. Seed growth characteristics of soybean genotypes differing in duration of seed fill. *Crop Science* 27:85-89.
- Sweeney PM, St. Martin SK, Clucas CP. 1994. Indirect inbred selection to reduce grain moisture in maize hybrids. *Crop Science* 34:391-396.
- Tanksley SD. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233.
- Thomas H, Smart CM. 1993. Crops that stay green. *Annals of Applied Biology* 123:193-219.
- Thomison P. 2004. *Corn Drydown*. Ohio State University. <http://corn.osu.edu/story.php?setissueID=54&storyID=288>
- Tollenaar M, Daynard TB. 1978. Effect of defoliation on kernel development in maize. *Canadian Journal of Plant Science* 58:207-212.
- Troyer AF, Ambrose WB. 1971. Plant Characteristics affecting field drying rate of ear corn. *Crop Science* 11:529-531.
- USDA. United States Department of Agriculture. 2017. <https://www.usda.gov/>
- Valdez SD, García F, Caviglia O. 2014. Maíz tardío en Entre Ríos, Argentina: Calibración de umbrales críticos en nitrógeno. <http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/>
- Wang Z, Wang X, Zhang L, Lui X, Di H, Li T, Jin X. 2012. QTL underlying field grain drying rate after physiological maturity in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 185:521-528.

- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB. 2011. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Westgate M. 1994. Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. *Crop Science* 34:76-83.
- Westgate M, Boyer J. 1986. Reproduction at low silk and pollen water potentials in maize. *Crop Science* 26:951:956.
- Xu Y, Crouch JH. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science* 48:391-407.
- Zalapa JE, Staub JE, McCreight JD, Chung SM, Cuevas H. 2007. Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US western shipping melon germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1185-1201.
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.

## ANEXO I



**Fig. 6.** Distribución de frecuencias relativas para los caracteres tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado (TS), stay green (SG), número de chalas (Nch) y largo de chalas (Lch): para las RILs en siembra temprana (A, B, C, D y E), en siembra tardía (F, G, H, I y J); las flechas indican los valores de los parentales: parental 1 (P1) y parental 2 (P2).



**Fig. 7.** Distribución de frecuencias relativas para los caracteres tiempo térmico a antesis (TTA), tasa de secado (TS), stay green (SG), número de chalas (Nch) y largo de chalas (Lch): para los híbridos en siembra temprana (A, B, C, D y E), en siembra tardía (F, G, H, I y J).