

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al
Grado de Ingeniera Agrónoma

Modalidad: Proyecto

ORDENAMIENTO DE HÍBRIDOS DE MAÍZ
CARACTERIZADOS CON DESCRIPTORES
MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS

Alumna: **ORTOLAN, TATIANA ANABELA**

DNI: 33.959.923

Director: **DI RENZO, MIGUEL ÁNGEL**

Codirectora: **BONAMICO, NATALIA CECILIA**

Río Cuarto – Córdoba

Octubre de 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Ordenamiento de híbridos de maíz
caracterizados con descriptores moleculares y morfológicos.

Autor: Ortolán, Tatiana Anabela

DNI: 33.959.923

Director: Di Renzo, Miguel Ángel

Codirectora: Bonamico, Natalia Cecilia

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del
Jurado Evaluador:

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

DEDICATORIA

El siguiente trabajo se lo dedico a mi familia por haberme acompañado durante la carrera.

A mi mamá Marta, quien creyó y dedicó lo más valioso que tiene una persona y que jamás podrá recuperar, su tiempo...

A mi hermana Analía, quien ha estado impulsándome en muchos de los proyectos de mi vida y quien se ha convertido en un ejemplo y una fuente de inspiración...

A mi hermano Danilo, quien es sinónimo de respeto, justicia y esfuerzo y quien día tras día me lo ha ido transmitiendo para hacerme una mejor persona...

Y se lo dedico al único miembro de mi familia quien hoy ya no me acompaña físicamente, pero que creyó, apostó y luchó de todas las formas posibles y que sólo un padre podría hacer para lograr esto que hoy soy...

Se lo dedico a mis compañeras incondicionales de aula Carolina y Ornella, quienes siempre estuvieron apoyándome, no solo en la carrera sino también en cada aspecto de mi vida... Y a mis compañeros Mariano, Gonzalo, Santiago y Nicolás...

Finalmente, se lo dedico a Dios...

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento a Dios, por haberme dado la templanza, la fortaleza y el espíritu de lucha necesario para alcanzar este sueño, el de convertirme en Ingeniera Agrónoma.

Le agradezco a mi familia, por haberme dado la oportunidad de acceder a un título universitario y por desearme siempre lo mejor. Le agradezco por haberme brindado todo el afecto, el apoyo y los recursos necesarios para lograr esta meta.

Le doy gracias a cada uno de los miembros de la Cátedra de Mejoramiento Genético. A Miguel Di Renzo, quien confía en cada uno de los alumnos que llegan día tras día pidiendo un espacio para realizar nuestros trabajos. A Mercedes Ibáñez, quien pone todo su conocimiento a disposición para alcanzar nuestros objetivos. Y le doy gracias a Natalia Bonamico, porque sé que sin su apoyo académico y emocional este camino hubiese sido muy difícil y quien se ha convertido al igual que cada uno de los miembros en algo más que docente para mí. Gracias por brindarme su amistad.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por formarme como profesional y permitirme ver el mundo de otro modo.

ÍNDICE

RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Criadero y nombre de los genotipos híbridos de maíz.	8
Cuadro 2. Variables morfológicas con sus correspondientes siglas y unidades de medidas en siete genotipos híbridos de maíz comerciales, obtenido de cada uno de los seis ambientes.	9
Cuadro 3. Nombre, sigla y ubicación de los seis ambientes en donde se obtuvieron las variables morfológicas.	9
Cuadro 4. Resultados del análisis de correlación entre variables morfológicas en todos los ambientes.	14
Cuadro 5. Suma de cuadrados del análisis de procrustes generalizado combinando información proveniente de seis ambientes en donde se evaluaron siete genotipos híbridos de maíz mediante siete variables morfológicas.	19
Cuadro 6. Suma de cuadrados del análisis de procrustes generalizado combinando información proveniente de seis variables morfológicas, 52 marcadores moleculares en cada uno de los seis ambientes, para siete genotipos híbridos de maíz.	21

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA de los 12
coeficientes de distancia (Jaccard (1-S)) con variables moleculares de marcadores
SSR para un conjunto de dieciocho genotipos híbridos de maíz.
- Figura 2.** Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con 13
variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de dieciocho
genotipos híbridos de maíz.
- Figura 3.** Dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA de los 15
coeficientes de distancia (Jaccard (1-S)) con variables moleculares para un
conjunto de siete genotipos híbridos de maíz.
- Figura 4.** Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con 16
variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de siete genotipos
híbridos de maíz mediante el coeficiente Jaccard.
- Figura 5.** Gráfico biplot obtenido a partir del análisis de componentes principales. 18
Ordenamiento producido a partir de siete variables morfológicas y siete genotipos
híbridos de maíz evaluados en seis ambientes.
- Figura 6.** Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado 20
desde la matriz de las variables morfológicas de siete genotipos híbridos de maíz
en seis ambientes.
- Figura 7.** Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado 22
desde la matriz de las variables morfológicas (en seis ambientes) y moleculares de
siete genotipos híbridos de maíz.

RESUMEN

El maíz es el tercer cultivo de importancia en el mundo junto con el arroz y el trigo. La obtención de diferentes cultivares implica gran trabajo de investigación y desarrollo en programas de mejoramiento. Tradicionalmente, la caracterización de genotipos se basó en atributos morfológicos. La descripción morfológica, carece de objetividad por la influencia ambiental y por los efectos genéticos de tipo no aditivo. El uso de marcadores moleculares ha sido implementado para la identificación de genotipos. El objetivo del presente trabajo fue obtener el ordenamiento de un conjunto de híbridos de maíz. Los genotipos fueron caracterizados con descriptores moleculares y morfológicos. Las variables morfológicas fueron obtenidas en seis ambientes. Con las variables moleculares se realizó un análisis de conglomerados y un análisis de coordenadas principales. Los ordenamientos obtenidos fueron parcialmente coincidentes. Con las variables morfológicas se realizó un análisis de correlación de Pearson y un análisis de componentes principales (ACP). Las configuraciones individuales del ACP fueron utilizadas en un análisis de procrustes generalizado (APG). El APG evidenció diferencias en el ordenamiento de los materiales en los distintos ambientes. Un APG se realizó empleando las componentes calculadas mediante el modelo AMMI (variables morfológicas) y las coordenadas del análisis de coordenadas principales (variables moleculares). El consenso entre el ordenamiento obtenido a partir de los marcadores moleculares y el producido a partir de las variables morfológicas fue alto y permitió observar el parecido entre los genotipos híbridos de maíz utilizados.

Palabras clave: *maíz, marcadores moleculares, análisis de procrustes generalizado (GPA)*

SUMMARY

ORDERING OF MAIZE HYBRIDS CHARACTERIZED WITH DESCRIPTORS MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL

Maize is the third most important crop in the world together with rice and wheat. Obtaining different cultivars involves lot of research work and the development in breeding programs. Traditionally, the genotype characterization was based on morphological attributes. The morphological description, lacked objectivity by environmental influence and non-additive genetics effects. The use of molecular markers has been implemented for genotype identification. The aim of this study was to obtain the ordering of a set of maize hybrids. The genotypes were characterized with molecular and morphological descriptors. Were obtained the morphological variables in six environments. With molecular variables was performed cluster analysis and principal coordinate analysis. The ordering obtained were partially coincidence. With morphological variables was performed an analysis of Pearson correlation and principal component analysis (PCA). The individual settings ACP were used on a generalized procrustes analysis (APG). The APG showed differences in the ordering of materials in different environments. An APG was performed using the components calculated using the AMMI model (morphological variables) and the coordinates of the principal coordinate analysis (molecular variables). The consensus among the ordering obtained from molecular markers and produced from morphological variables was high and allowed to observe the similarity between hybrid maize genotypes used.

Keywords: *corn, molecular markers, generalized procrustes analysis (GPA)*

INTRODUCCIÓN

Importancia del cultivo de maíz

El maíz es el tercer cultivo de mayor importancia en el mundo luego del arroz y del trigo (Levitus, 2006). Originario de Centroamérica y con varios sitios de diversidad que se encuentran en México y los Andes centrales de América del Sur, este cultivo deriva de plantas muy similares conocidas como “teosintes”, que crecen de manera silvestre en las áreas de México y Guatemala. Hay en el mundo más de 250 razas de maíz reconocidas (Abdo, 2012), siendo 40 las autóctonas descritas en Argentina (Eyherabide, 2006). Existen maíces de diferentes colores de granos, tipos de granos (harinosos o duros), de espigas grandes o pequeñas y con granos de diferente tamaño. Las plantas pueden medir desde menos de un metro en zonas templadas hasta casi cuatro metros en ambientes tropicales (Abdo, 2012).

La producción de maíz de la campaña 2002/03 fue aproximadamente de 15 millones de toneladas con un rinde promedio nacional de 65 qq/ha para un área sembrada de 3 millones de hectáreas. En las últimas diez campañas, la producción se incrementó en un 45%, siendo el tercer cultivo de la Argentina luego de la soja y del trigo. En la década del 90 se produce el crecimiento definitivo del maíz, debido a los importantes incrementos en la cantidad de grano producido y en la calidad, acusando un rinde medio nacional de 46 qq/ha (Pastor, 2004).

En relación a las provincias productoras, Córdoba es la de mayor producción, produciendo el 38% de la producción nacional; Buenos Aires es la segunda con el 28% de la producción y tercera está Santa Fe con un 14% (Pastor, 2004).

Argentina participa en un 2% de la producción mundial; exporta cerca del 65% de su producción (2° exportador mundial) con tendencia creciente y destina al mercado interno la diferencia. En síntesis, exporta cerca de 10 millones de toneladas y destina al mercado interno, las 5 restantes (Pastor, 2004).

Del volumen total para el consumo interno, más de un 80% se destina a la alimentación animal bajo las formas de balanceado, silaje de maíz, derivados de la molienda o directamente grano entero, partido y/o molido, siendo el consumo en campo y la molienda en su conjunto los principales demandantes del maíz internamente (Pastor, 2004).

El maíz cultivado en la Argentina presenta una madurez relativa de 110 a 130 días, siendo de 110 a 115 días el ciclo ideal para la región sudeste de la provincia de Buenos Aires; de 115 a 125 para la región pampeana central y de 125 a 130 días para zonas subtropicales. Es un cultivo cuyo aumento en el rendimiento está asociado a su mejoramiento genético, utilización de fertilizantes, incorporación de riego complementario, utilización de híbridos con mayor potencial de rendimiento y resistencia a enfermedades y plagas, el uso de semillas transgénicas, entre otras tecnologías (Gear, 2006). Su producción pasó de 7,7 millones de toneladas (campaña 1990/91) a 19,4 millones de toneladas en el ciclo agrícola 1997/98. Para el mismo período, la mayor variación porcentual en las producciones medias por hectárea le corresponde al maíz con un 41,2% de aumento (SAGPyA, 2010). Sin embargo, a partir de la campaña agrícola 1997/98 se ha verificado un continuo desplazamiento del cultivo del maíz a favor de la soja. No obstante, el maíz presenta múltiples posibilidades de utilización en diversos procesos industriales, de los que se obtiene una amplia gama de productos derivados.

Mejoramiento genético

La obtención de las diferentes variedades comerciales implica para los criaderos un gran trabajo de investigación y el consecuente desarrollo de costosos programas de mejoramiento. Esto ha promovido el desarrollo de una legislación que les concede a los creadores los derechos de propiedad industrial de las obtenciones vegetales. En Argentina dicha legislación está ordenada con el N° 20.247/73 (Ley de Semillas y Creaciones Fitotécnicas) y el organismo responsable de su aplicación es el Instituto Nacional de Semillas dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. La Ley de Semillas y Creaciones Fitotécnicas establece que, para que un cultivar pueda ser objeto de título de propiedad deberá reunir condiciones de distinguibilidad, homogeneidad y estabilidad.

El conocimiento de la diversidad genética ha tenido un impacto significativo en mejoramiento vegetal siendo útil la información generada, tanto en la planificación de cruces para la obtención de híbridos y de líneas, como en la asignación de líneas a grupos heteróticos y en la protección varietal (Arnao *et al.*, 2010). Tradicionalmente la caracterización de los genotipos, que se basó en atributos morfológicos de la semilla, de la inflorescencia o de la planta, careció de objetividad y definición por la acentuada influencia ambiental así como por efectos genéticos de tipo no aditivo. El rendimiento de un híbrido simple depende de la acción genética dominante y epistática cuando se hace el ensamblaje respectivo. Al evaluar el comportamiento *per se* de las líneas, se puede conocer la contribución de los efectos aditivos en el híbrido; pero no los efectos epistáticos y de dominancia. El uso de los marcadores moleculares para estimar la divergencia entre pares de

líneas mejoradas ha sido implementado como una medida para superar este inconveniente y permitir la identificación y predicción del comportamiento de híbridos simples (Hernández *et al.*, 2010). En la actualidad existe gran interés en utilizar técnicas de análisis molecular que permitan estudiar de una manera sistemática la variación presente a nivel del ADN, y que además puedan ser utilizadas por mejoradores y criadores como herramientas complementarias en la caracterización realizada con datos morfológicos.

Dentro de estas técnicas de análisis molecular se hallan los marcadores moleculares del ácido desoxirribonucleico (ADN). Estos son secuencias genómicas localizadas en un mismo *locus* que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas a consecuencia de mutaciones o arreglos cromosómicos, de manera que reflejan directamente las variaciones a nivel del ADN, pueden ser dominantes o codominantes, y son estables e independientes del ambiente de desarrollo del organismo analizado. Estas características los hacen útiles en la identificación varietal (Valadez y Kahl, 1999).

Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad tanto para la caracterización de genotipos como para los estudios de similitud o distancia genética. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha provisto la tecnología para el desarrollo de una serie de sistemas que detectan polimorfismo a nivel del ADN (Milbourne *et al.*, 1997). El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y ADN polimerasa. Esta reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde. Estos productos son polimórficos cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un nucleótido en la cadena molde de ADN genómico (Becerra y Paredes, 2011).

Dillman *et al.* (1997) sugieren el uso del polimorfismo en las longitudes de los fragmentos de restricción (RFLP) pero estos marcadores son costosos para ser aplicados en gran escala. Los RFLP son causados por arreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con una sonda. A la vez permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN (exones e intrones). Las principales ventajas de los RFLP radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Becerra y Paredes, 2011).

Otros autores manifiestan que la diversidad informada por las secuencias simples repetidas o microsatelites (SSR) es similar y de menor costo a la de los RFLP (Pejic *et al.*, 1998), mientras que Bermejo *et al.* (2010) proponen la utilización del polimorfismo

amplificados relacionados con la secuencia (PAS). Los marcadores SSR, permiten identificar híbridos simples de maíz, aun cuando ellos estén relacionados genéticamente (Bonamico *et al.*, 2004). Los marcadores SSR son secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Estas secuencias se encuentran repetidas en tándem y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas y microorganismos. El nivel de polimorfismo que detectan permite una discriminación precisa entre individuos emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsátélites requieren cantidades mínimas de ADN para su amplificación por PCR (Becerra y Paredes, 2011).

La generación, así como la evaluación de cruces en los programas de mejoramiento, requiere de tiempo y recursos, ya que se tiene que sembrar en un campo donde se realizan los cruces con al menos dos probadores y luego, en la época convencional de siembra, se llevan a las zonas de producción para evaluar su aptitud combinatoria y estabilidad a través de diseños experimentales específicos. Si esta evaluación se realiza con el apoyo de marcadores moleculares, además de obtener dicha información en menos tiempo, se reduce la realización de varios ensayos de pruebas que involucran gastos significativos. Adicionalmente, su uso permite la caracterización molecular de genotipos con fines de propiedad intelectual y el uso eficiente de la variabilidad genética (Warburton *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2010).

Análisis estadístico

Análisis de correlación lineal

El objetivo del análisis de correlación lineal es conocer la relación funcional entre dos variables numéricas, o sea estudiar si están linealmente asociadas en el sentido que al aumentar el valor observado en una de las variables, aumenta o disminuye linealmente el valor observado en la otra variable. La medida de dicha asociación se puede realizar a través del coeficiente de correlación de Pearson. El coeficiente de correlación de Pearson (r) es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables numéricas. Valores cercanos a 1 indican alta correlación lineal positiva y valores cercanos a -1 indican alta correlación lineal negativa. Si el coeficiente se aproxima a cero indica que no hay correlación lineal entre variables. Para probar si un coeficiente de correlación es estadísticamente distinto de cero se realiza la prueba de hipótesis (Balzarini *et al.*, 2010).

Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados es una combinación de técnicas que tienen por objeto la búsqueda de grupos similares. Cuando se realizan agrupamientos de casos se busca clasificar a los objetos en grupos lo más homogéneos posible en base a todas las variables involucradas. Los resultados del agrupamiento se visualizan en un dendrograma (Balzarini *et al.*, 2010). Respecto a medidas de distancias, es importante seleccionar una que se adecue al tipo de datos (cuantitativo o categorías). Cuando las variables poseen naturaleza binaria, como puede ser el caso de presencia/ausencia de determinadas características un índice de similitud muy utilizado es el índice de Jaccard. Este debiera usarse cuando por la naturaleza del problema, se supone que dos objetos son más parecidos entre sí por presencia de una característica que por ausencia (Balzarini *et al.*, 2010).

Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (ACoorP) es una técnica multivariada propuesta por Gower (1975) que se utiliza para ordenar de manera espacial el material caracterizado molecularmente. El objetivo es ordenar las observaciones en un espacio tal que las distancias o similitudes sean preservadas tanto como sea posible (Bruno y Balzarini, 2010). Para la correcta aplicación de esta técnica se deben estimar en primera instancia las distancias entre los individuos. El ACoorP permite graficar a los materiales o genotipos de acuerdo a las medidas de distancias entre ellos (Balzarini *et al.*, 2010).

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) tiene como objetivo la transformación de un conjunto de variables continuas, o al menos ordinales, que originalmente pueden estar correlacionadas, en un grupo de variables no correlacionadas denominadas componentes principales (CP), que serán usadas como ejes para generar un plano que permita representar las observaciones de manera tal que en ese plano se represente lo mejor posible la variabilidad de las variables originales en el espacio multidimensional. Las componentes se ordenan según los niveles de información (variabilidad que expresan los datos sobre éstas). Por medio de los gráficos biplot (Gabriel, 1971) se grafican en un plano las observaciones y las variables de manera simultánea. El plano conformado usando como ejes a las dos primeras componentes (CP1 y CP2), es el que explica mayor porcentaje de variabilidad total (Balzarini *et al.*, 2010).

Análisis de procrustes generalizado

El análisis de procrustes generalizado (APG) es utilizado ampliamente en caracterización de material genético cuando la misma se realiza mediante un conjunto de

marcadores morfológicos y otro conjunto de marcadores moleculares (Aiassa, 2004; Bonamico *et al.*, 2004; Zuliani *et al.*, 2012).

El APG consiste en ordenar los genotipos según cada conjunto de descriptores y luego buscar un espacio común donde mejor se correspondan las ordenaciones. El análisis de procrustes fue utilizado inicialmente para adecuar una configuración a otra ya representada. La adecuación de configuraciones se describió como una transformación donde una matriz es rotada y reducida según especificaciones de una matriz establecida. La matriz transformada debe coincidir tanto como sea posible con la matriz establecida. Bajo el criterio de rotar una matriz para ajustarla a otra, es posible rotar varias matrices a una matriz centroide común. Esto es lo que se conoce con el nombre de análisis de procrustes generalizado.

Las asociaciones genoma-fenoma pueden realizarse vía diversas técnicas, tanto con modelos estadísticos paramétricos y semi paramétricos como con técnicas multivariadas. Entre estas últimas el APG juega un rol importante (Fissore, 2013; Rossi, 2013).

Modelo AMMI

Los primeros modelos lineales-bilineales usados en ensayos agrícolas multiambientales fueron llamados modelos de efectos aditivos e interacción multiplicativa o modelos AMMI por Zobel y Gauch (1988). Cuando se dispone de información fenotípica proveniente de distintos ambientes es posible observar interacción genotipo ambiente (GE) significativa y por ello se requiere aplicar este modelo para calcular componentes que permitan resumir la información en forma multivariada teniendo en cuenta la interacción. Cuando se usa el análisis de componentes principales, los genotipos con valores cercanos a cero en la CP1 son interpretados como de menor contribución en la interacción GE. Los modelos AMMI, suelen denominarse como AMMI (1), AMMI (2),..., AMMI (n) dependiendo del número de componentes principales usadas para modelar la interacción. Se debiera seleccionar un número de componentes tal que se explique un alto porcentaje de la variación de interés, en este caso la variación debida a la interacción. El porcentaje acumulado de variación explicada por las componentes seleccionadas debiera ser similar al porcentaje de variación explicada por la interacción respecto al error que acusó la tabla de ANAVA de un modelo completo, o sea un modelo conteniendo los términos de genotipo, ambiente, interacción y error (Balzarini *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares microsatélites (SSR) son suficientemente informativos para caracterizar híbridos de maíz procedentes de diferentes criaderos, así como para estimar las distancias genéticas entre ellos. La información genotípica mantiene estrecha relación con la información fenotípica de un conjunto de híbridos de maíz y permite obtener un adecuado consenso entre el ordenamiento producido por los datos genéticos (variables moleculares) y el ordenamiento producido por los datos fenotípicos (variables morfológicas).

OBJETIVOS

- Caracterizar genéticamente un conjunto de híbridos de maíz provenientes de distintos criaderos mediante marcadores moleculares SSR.
- Recopilar información fenotípica, a partir de ensayos del INTA, para el mismo conjunto de híbridos de maíz.
- Obtener un ordenamiento genotípico y fenotípico a partir de las variables moleculares y morfológicas.
- Obtener un ordenamiento consenso a partir de las variables moleculares y morfológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

El estudio incluyó 18 genotipos híbridos de maíz, pertenecientes a distintos criaderos comerciales (Cuadro 1). En primera instancia se realizó el análisis molecular en la totalidad de los genotipos. Luego, se continuó con siete híbridos para los cuales se logró reunir información fenotípica correspondiente a siete caracteres (Cuadro 2), en seis ambientes de la Provincia de Buenos Aires (Cuadro 3).

Cuadro 1. Criadero y nombre de los genotipos híbridos de maíz.

Criadero	Híbrido	Sigla
Monsanto	DK 664 MG	D1
Monsanto	DK 752 MG	D2
Monsanto	DK 682 MG	D3
La Tijereta	LT C 271 MG	L1
La Tijereta	LT 650	L2
DOW	MORGAN M 10	M1
DOW	MORGAN 532 BT	M2
Nidera	AX 828	A1
Nidera	AX 889	A2
Nidera	AX 888 IT	A3
Nidera	AX 934	A4
Nidera	AX 933	A5
Nidera	AX 840	A6
Nidera	AX 800 MG	A7
Nidera	AX 882	A8
Sursem	ALBION	SU
Syngenta	CONDOR	S1
Syngenta	CHALTEN TD	S2

Cuadro 2. Variables morfológicas con sus correspondientes siglas y unidades de medidas en siete genotipos híbridos de maíz comerciales, obtenido de los ambientes de Barrow, Balcarce, Ochandio, San Francisco de Belloq, Tandil y El Triángulo.

Variabes morfológicas	Sigla	Unidad de medida
Rendimiento	RTO	kg/ha
Humedad a cosecha	HC	%
Días de emergencia a floración	DF	N° de días
Altura de la planta	AL	cm
Altura de inserción de espiga	AE	cm
Relación espiga/planta	EP	-
Longitud de ciclo	LC	N° de días

Cuadro 3. Nombre, sigla y ubicación de los seis ambientes en donde se obtuvieron las variables morfológicas.

Ambiente	Sigla	Latitud	Longitud
Barrow	BW	60°13'55" O	38°18'36" S
Balcarce	BE	58°15'18" O	37°50'16" S
Ochandio	OC	59°47'00" O	38°20'59" S
San Francisco de Belloq	SF	60°00'54" O	38°41'28" S
Tandil	TL	59°08'59" O	37°19'03" S
El Triángulo	ET	58°42'23" O	34°27'17" S

Extracción de ADN

La extracción de ADN, se realizó con 50 g de semillas de cada genotipo y se aplicó el método DJ JRC, Enviroment Institute Consumer Protection y Food Unit, basado en la extracción a partir de harina de semilla (Anexo 1). Después de la extracción de ADN, se realizaron diluciones 1:10 de los ADN stocks en agua HPLC. La calidad y la cuantificación del ADN extraído se evaluó visualmente por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v en buffer TBE (Buffer Tris-Borato-EDTA, pH 8) IX, conteniendo 1,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) cada 100 ml de buffer TBE. El ADN se sembró en el gel en un volumen final de 12 µl (4 µl ADN + 5,5 µl de agua HPLC + 2,5 µl de bufer de carga 5X (Glicerol 50% v/v, azul de bromofenol 0,1% p/v, ficoll 400, 2% p/v EDTA (pH 8) 100 mM)). Además, se incluyó 2 µl de un marcador de peso molecular, lambda hind III, con una concentración de 50 ng/µl cuya banda más intensa representa el 50% de la cantidad total, es decir 50 ng. La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodo TBE 0,5X a 40V constantes.

Terminada la electroforesis, el gel fue expuesto a un transiluminador UV (ultravioleta) y fotografiado para su documentación.

La cuantificación del ADN se realizó por comparación relativa entre la fluorescencia de la banda superior del marcador de peso molecular (50 ng) y la banda de ADN a evaluar. Luego de verificar la calidad y evaluar la cantidad del ADN, se ajustaron las concentraciones de las muestras de ADN para realizar las reacciones de PCR. La concentración final es de 50 ng/μl. Los stocks fueron conservados a -20 °C para preservarlos de la actividad de las enzimas ADNasa.

Variables moleculares

Para generar la información molecular se utilizaron 52 marcadores moleculares SSR. La facilidad para su amplificación por PCR y su condición codominante, han contribuido en una amplia difusión en un extenso rango de estudios genéticos. Todos los marcadores fueron probados en el conjunto de genotipos híbridos de maíz. La reacción de PCR se llevó a cabo en un tubo. En él, además del ADN se agregaron los dos indicadores, cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos, buffer 10X (Tris-ClH (pH 8) 200 mM, ClK 500 mM), Cl₂ Mg como cofactor y la enzima *Taq* polimerasa. Todos estos reactivos se llevaron a volumen final de 20 μl con agua HPLC. En el Anexo 2 se presenta el cuadro con los componentes y cantidades de la mezcla de reacción de PCR. El termociclador BIOMETRA UNO - thermoblock incluye una tapa metálica que cubre los tubos y que posee control de la temperatura hasta los 100 °C, impidiendo la evaporación y el consiguiente cambio del volumen de reacción durante las distintas etapas del programa de amplificación. El aparato debe ejecutar un periodo de calentamiento a 95 °C durante 2 a 5 min para asegurar la desnaturalización de las cadenas del ADN a amplificar y luego entrar en los 20 a 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y amplificación. En todas las reacciones se realizó un control negativo, colocando para ello en un tubo todos los componentes de la reacción excepto el ADN, el cual fue reemplazado por igual volumen de agua. La ausencia de amplificación en este control asegura que la amplificación observada en el resto de los tubos es debida al ADN de la muestra y no a la presencia de contaminantes en los componentes de la reacción. En el Anexo 3 se indica el programa del ciclador térmico (BIOMETRA UNO – Thermoblock).

Para visualizar los productos de amplificación la electroforesis fue realizada en geles de agarosa Metaphor (BMA-FMA Bio Whittaker, Rockland, ME USA) al 4% p/v en buffer TBE IX (Anexo 4) sumergido en buffers de electrodos TBE 0,5X, manteniendo a 60 V constantes. Una vez finalizada la electroforesis de los fragmentos amplificados, el gel fue expuesto en un transiluminador UV y fotografiado para su documentación.

Análisis estadístico

Con los 18 híbridos comerciales de maíz se obtuvieron datos moleculares mediante los 52 marcadores SSR. Con ellos, se realizó un análisis de conglomerados y ACoorP.

Luego, se continuó con un conjunto de siete híbridos, en seis ambientes diferentes (BW – BE – OC – SF– TL y ET) para los cuales se obtuvieron datos de siete variables morfológicas (RTO – DF – AL – HC – AE – EP y LC). Los datos de las distintas variables fueron utilizados para estimar las correlaciones lineales entre todos los caracteres, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Estos coeficientes de correlación permitieron describir la magnitud de la asociación lineal entre caracteres.

Las variables morfológicas fueron analizadas con un enfoque multivariado mediante el ACP en cada uno de los ambientes individuales y también considerando todos los ambientes de manera conjunta. Posteriormente, se realizó un APG (Balzarini *et al.*, 2010). Para realizar el APG se conformó un archivo con las componentes obtenidas del ACP de marcadores morfológicos. Mediante este análisis de procrustes se buscó cuantificar el consenso entre la ordenación a partir de todas las variables morfológicas, de los distintos híbridos de maíz en cada uno de los distintos ambientes.

Un modelo AMMI se aplicó con cada una de las variables morfológicas para generar las componentes considerando todos los ambientes. De un ACoorP, realizado con los marcadores moleculares, se guardaron las tres coordenadas principales que más variabilidad explicaron. Posteriormente, con estas componentes y coordenadas se realizó un APG. Mediante este análisis de procrustes se buscó cuantificar el consenso, entre la ordenación de los distintos híbridos obtenida por el análisis de coordenadas principales de la matriz de distancias genéticas y la ordenación de los mismos híbridos obtenida mediante un modelo AMMI con los datos fenotípicos.

Todos los análisis se realizaron con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2004).

RESULTADOS

Análisis de dieciocho híbridos comerciales de maíz

Análisis de conglomerados

En la Figura 1 se observa la representación gráfica o dendrograma resultante del análisis de conglomerados utilizando la distancia de Jaccard ($1 - S$). Esta clasificación muestra dos grupos claramente definidos, en el que separa a la totalidad de los materiales del híbrido S1. A su vez en el primer conjunto se distinguen cinco subgrupos. El primero de ellos incluye a A2 y A3; el segundo a M1, M2, A6 y A8; el tercero a A4 y A5; el cuarto a L1, L2, A1 y A7 y el último subgrupo incluye a D1, D2, D3, S2 y SU.

El coeficiente de correlación cofenética (CCC) encontrado es de 0,892. Esto muestra una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma y que la técnica de ligamiento promedio es la que origina menor distorsión con respecto al ligamento simple y completo.

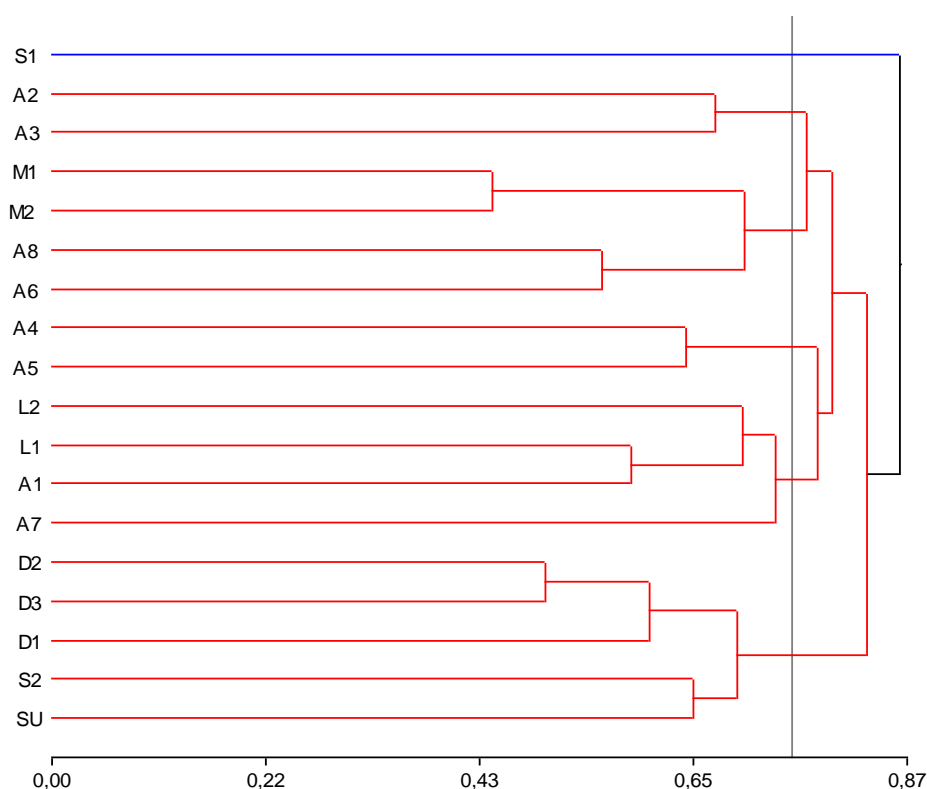


Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de distancia (Jaccard ($1-S$)) con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de 18 genotipos híbridos de maíz.

D1: DK 664 MG, **D2:** DK 752 MG, **D3:** DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **L2:** LT 650, **M1:** MORGAN M10, **M2:** MORGAN 532 BT, **A1:** AX 828, **A2:** AX 889, **A3:** 888 IT, **A4:** AX 934, **A5:** AX 933, **A6:** AX 840, **A7:** AX 800, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN, **S1:** CONDOR, **S2:** CHALTEN.

Análisis de coordenadas principales

En la Figura 2 se observa la representación gráfica del ACoorP de los datos de marcadores moleculares SSR. Las dos coordenadas formadas permiten ubicar espacialmente los grupos de genotipos híbridos que presentan menor distancia. Un 33% de la variabilidad total es explicada por el gráfico construido con los dos primeros ejes del ACoorP. Si se toma un eje más se alcanza un porcentaje de variabilidad del 43%. La combinación de ambas coordenadas permite evidenciar tres grupos bien definidos, el primero de ellos reúne a los híbridos M1, M2, A2 y S1, el segundo a A1, A4, A5, A6, A7, A8, L1 y L2 y el tercero a A3, S2, SU, D1, D2 y D3. Los híbridos que más se diferencian entre sí son A6 y SU.

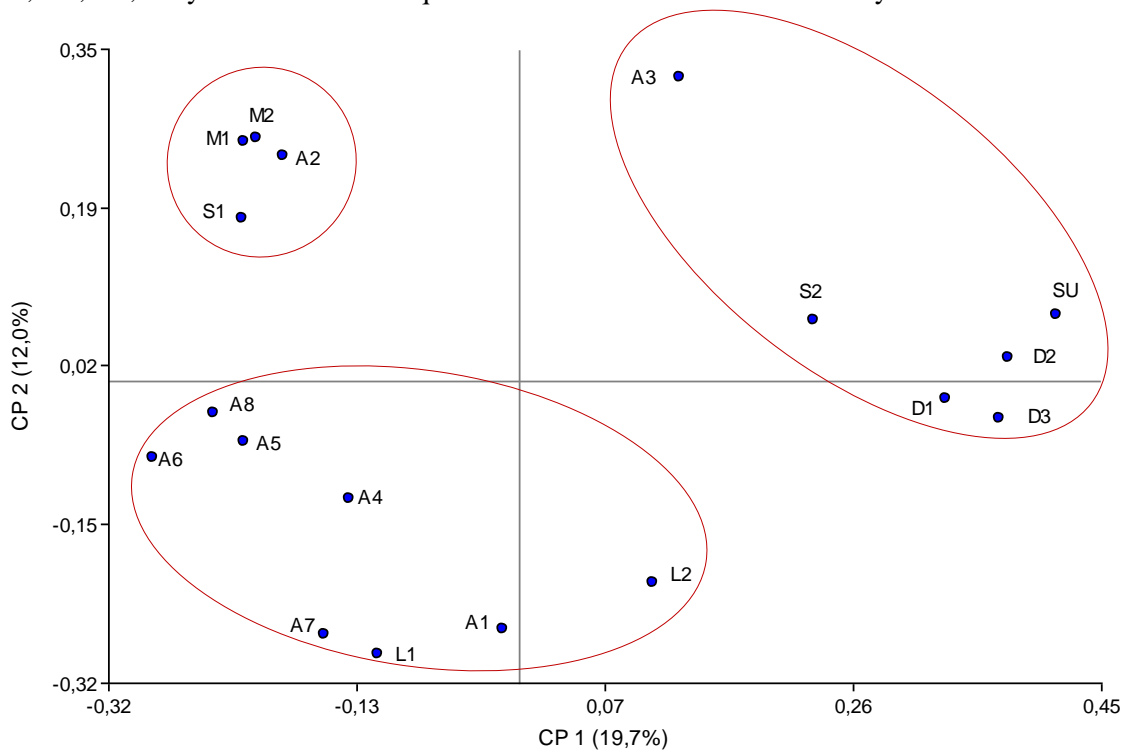


Figura 2. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de 18 genotipos híbridos de maíz. CP1 y CP2: Coordenada principal uno y dos.

D1: DK 664 MG, **D2:** DK 752 MG, **D3:** DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **L2:** LT 650, **M1:** MORGAN M10, **M2:** MORGAN 532 BT, **A1:** AX 828, **A2:** AX 889, **A3:** 888 IT, **A4:** AX 934, **A5:** AX 933, **A6:** AX 840, **A7:** AX 800, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN, **S1:** CONDOR, **S2:** CHALTEN TD.

Análisis de siete híbridos comerciales de maíz en seis localidades

Coefficiente de correlación a través de los ambientes

En el Cuadro 4 se presenta la matriz de correlaciones entre todas las variables morfológicas obtenidos a partir del coeficiente de correlación de Pearson en todos los ambientes. Se observa que los DF presentan correlación lineal negativa significativa con las variables HC y RTO. A su vez, el RTO presenta correlación lineal negativa significativa con LC. Sólo AL con HC presentan correlación lineal positiva significativa.

Cuadro 4. Resultados del análisis de correlación entre variables morfológicas en todos los ambientes. Matriz con los coeficientes de correlación entre siete variables morfológicas.

	RTO	DF	AL	AE	HC	EP
DF	-0,33 *					
AL	0,25 n.s	-0,59 n.s				
AE	0,05 n.s	-0,49 n.s	0,78 n.s			
HC	-0,05 n.s	-0,40 *	0,33 *	0,52 n.s		
EP	0,05 n.s	0,06 n.s	0,26 n.s	-0,48 n.s	-0,83 n.s	
LC	-0,33 *	0,05 n.s	0,12 n.s	0,10 n.s	0,13 n.s	0,02 n.s

* = correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s. = no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Coefficiente de correlación particionado por ambiente

Al considerar cada uno los ambientes (BW, BE, OC, SF, TL y ET) se observaron correlaciones lineales estadísticamente significativas entre algunos pares de variables. En el ambiente de BW, AL con LC presentan correlación lineal positiva significativa ($r=0,79$, $p>0,03$) también, AL con RTO presenta asociación lineal negativa significativa ($r=-0,79$, $p>0,03$), al igual que LC con EP ($r=-0,77$, $p>0,04$). En BE, HC con AE presentan asociación lineal negativa significativa ($r=-0,79$, $p>0,03$). En SF, RTO con HC presentan asociación lineal positiva significativa ($r=0,87$, $p>0,01$). En TL, RTO con DF mostraron asociación lineal negativa significativa ($r=0,82$, $p>0,02$). En los ambientes de OC y ET no se observó asociación estadísticamente significativa entre pares de variables. En el Anexo 5 se presentan los cuadros con las matrices de correlaciones entre todas las variables obtenidas a partir del coeficiente de correlación de Pearson, en cada uno de los ambientes.

Análisis de conglomerados

La representación gráfica o dendrograma resultante del análisis de conglomerados utilizando la distancia de Jaccard ($1 - S$), permitió la formación de tres grupos (Figura 3). El grupo uno, formado por los genotipos M1, A8 y A6 y el grupo dos formado por L1 y A1,

incluyen a todos los híbridos pertenecientes a los criaderos Dow, Nidera y La Tijereta. Los híbridos SU y D3 no se agruparon con el resto y por lo tanto forman el grupo tres. Éstos pertenecen a los criaderos Sursem y Monsanto, respectivamente.

El coeficiente de correlación cofenética (CCC) encontrado es de 0,937. Esto muestra una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma y que la técnica de ligamiento promedio es la que origina menor distorsión con respecto al ligamiento simple y completo.

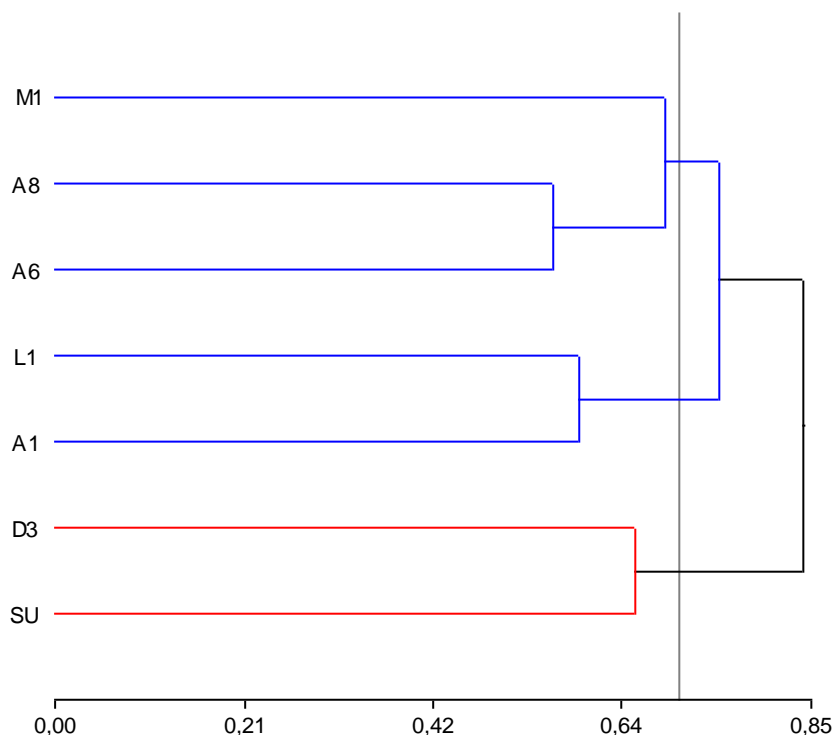


Figura 3. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de distancia (Jaccard (1-S)) con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de siete genotipos híbridos de maíz.

M1: MORGAN M10, **A8:** AX 882, **A6:** AX 840, **L1:** LT C 271 MG, **A1:** AX 828, **D3:** DK 682 MG, **SU:** ALBIÓN.

Además, se realizó un dendrograma resultante del análisis de conglomerados, pero utilizando la distancia de Dice. Es importante mencionar que si bien el índice de similitud utilizado en ambos casos es diferente, con ellos se arribó a los mismos resultados, ya que los híbridos se agruparon de la misma manera. En el Anexo 6 se presenta el dendrograma obtenido a partir de la matriz de distancia basada en el índice de similitud de Dice.

Análisis de coordenadas principales

Las dos primeras coordenadas formadas (CP1 y CP2), permiten ubicar espacialmente los grupos de híbridos que presentan menor distancia entre ellos. Un 56% de la variabilidad total es explicado por el gráfico construido con los dos primeros ejes del ACooP. A nivel

molecular la combinación de las dos coordenadas permite evidenciar tres grupos bien definidos. El primero de ellos formado por A6, A8 y M1, el segundo formado por A1 y L1 y el tercero por SU y D3. La CP2 indicó que SU y D3 son diferentes. Del mismo modo, la CP1 indicó que L1 es diferente de A1. Los híbridos A6 y A8 son los que más se diferencia con respecto a SU y el resto de los híbridos (Figura 4).

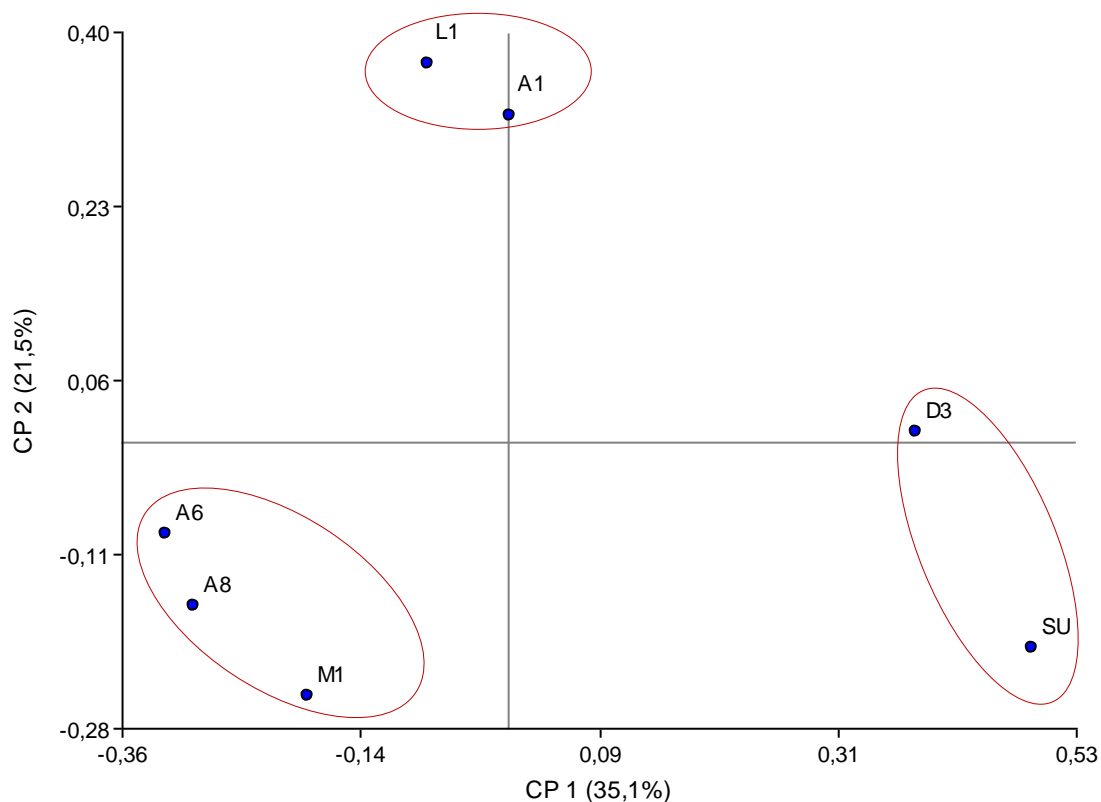


Figura 4. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de siete genotipos híbridos de maíz mediante el coeficiente de Jaccard. CP1 y CP2: Coordenada principal uno y dos.

D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX 882, SU: ALBIÓN.

Las coordenadas uno y tres formadas del ACoorP (Anexo 7), indican que un 50% de la variabilidad total es explicada por el gráfico construido. Es decir que las tres primeras CP explican el 70% de la variabilidad. A nivel molecular la combinación de la CP1 y la CP3 permite distinguir tres grupos. El primero de ellos formado por A6 y A8, el segundo está constituido por A1 y L1, el tercero por D3 y SU, quedando solo, sin agrupar, M1. La CP3 indicó que SU y A1 son diferentes de D3. El híbrido M1, es el que más se diferencia del resto de los híbridos.

Las coordenadas dos y tres (Anexo 8) indican que un 36,3% de la variabilidad total es explicada. A nivel molecular la combinación de ambas permite evidenciar dos grupos bien

definidos. El primero de ellos formado por A6, A8 y SU. El segundo constituido por D3, L1 y A1. La CP3 indicó que A1 es diferente de D3 y L1. El híbrido M1 es el que más se diferencia del resto.

Además, se realizó el ACoorP utilizando el coeficiente de Dice (Anexo 9) pudiendo determinar que la organización espacial de los siete híbridos es similar al determinado mediante el coeficiente de Jaccard. Se observan tres grupos bien definidos constituidos por A6, A8 y M1. El segundo grupo está constituido por A1 y L1 y el tercero por D3 y SU.

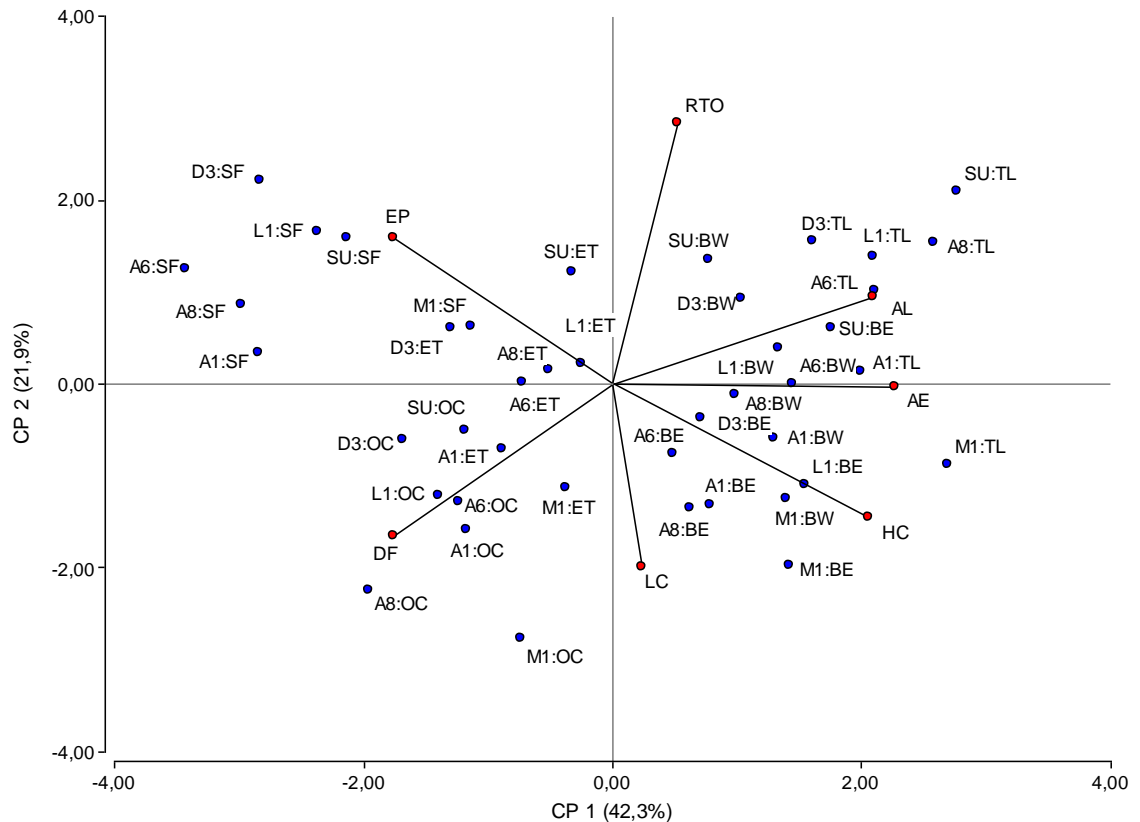
Análisis de componentes principales para los seis ambientes, los siete híbridos comerciales de maíz y las siete variables morfológicas

El 64% de la variabilidad total en el conjunto de casos es explicado por el primer plano factorial (CP1 y CP2). A nivel de la CP1, que es la componente que explica por sí sola el 42,3% de la variabilidad total, los casos correspondientes a los ambientes de SF, ET y OC se separan de los casos correspondientes a los ambientes de TL, BW y BE (Figura 5). Con el término separar se desea indicar que al realizar las proyecciones de los casos sobre la CP1, los valores correspondientes a las localidades de SF, ET y OC quedan con signos negativos, mientras que las proyecciones de TL, BW y BE poseen valores de signos positivos. Los casos cuyas proyecciones se encuentran más distantes del cero, son los casos más representativos de la variabilidad total. Se manifiestan mayores diferencias entre SU y M1 en TL, respecto de A6 y A8 en SF. Las variables RTO, AL, AE, HC y LC, presentaron mayores valores en los ambientes de BW, BC y TL para todos los materiales. Mientras que la EP y DF presentaron mayores valores en los ambientes de OC, SF y ET para todo el conjunto de híbridos.

El ángulo entre AL, AE y HC es agudo y cerrado, lo cual indica que estas variables están positiva y altamente correlacionadas, al igual que sucede entre LC y HC, y entre LC y DF. Mientras que no se correlacionan AL con LC y HC con RTO, ya que los vectores que las representan forman un ángulo recto. De igual manera no se correlacionan EP con RTO. Por otro lado, EP se encuentra correlacionada negativamente (ángulo obtuso) con AL, AE, HC y LC. También, DF está asociado negativamente con HC, AE, AL y RTO. Finalmente, el RTO y LC se encuentran correlacionados negativamente.

La CP2 permite diferenciar híbridos en cada uno de la ambientes. Los casos correspondientes a A1 en TL, A8 y A6 en BW y A6 en ET presentan proyecciones sobre la CP2 cercanas al cero, indicando que estos casos poseen poca inercia. Este análisis apoya lo observado mediante el análisis de correlación de Pearson para las variables morfológicas.

En el Anexo 10 se presenta el cuadro con los autovectores (e1 y e2) de cada variable en el análisis de componentes principales (ACP).



Análisis de procrustes generalizado entre todos los ambientes al considerar todas las variables morfológicas

El análisis de procrustes generalizado (APG) permitió observar que existe un consenso de 77,7% entre el ordenamiento producido por todas las variables morfológicas para los siete genotipos híbridos de maíz en cada uno de los seis ambientes (Cuadro 5). En la Figura 6 se observa el gráfico de dispersión de los ordenamientos individuales y de consenso entre las variables morfológicas de cada uno de los siete híbridos en los seis ambientes sobre los que se construyó el árbol de recorrido mínimo. Los autovalores indican que la variabilidad explicada mediante el eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso es del 55%. Los dos primeros ejes permitieron explicar el 100% de la variabilidad. El eje 1 fue capaz de separar los genotipos SU, A8, L1 y D3 del resto y ubicarlos en la zona positiva. Esto nos está indicando que dichos materiales presentan los mayores valores para las variables consideradas en los seis ambientes. Por el contrario los híbridos M1, A1 y A6 se posicionaron en el extremo negativo. Los materiales M1, A6 y A8 son los que mayor estabilidad presentan en los ambientes considerados.

Cuadro 5. Suma de cuadrados del análisis de procrustes generalizado (APG) combinando información proveniente de seis ambientes (BW – BE – OC – SF– TL y ET) en donde se evaluaron siete genotipos híbridos de maíz mediante siete variables morfológicas (RTO – DF – AL – HC – AE – EP y LC).

	Consenso	Residuo	Total	Proporción de Consenso
Grupo1	0,802	0,213	1,015	0,790
Grupo2	0,772	0,226	0,997	0,774
Grupo3	0,502	0,325	0,827	0,607
Grupo4	0,751	0,233	0,984	0,764
Grupo5	0,930	0,167	1,096	0,848
Grupo6	0,905	0,175	1,080	0,838
Total	4,662	1,338	6,000	0,777

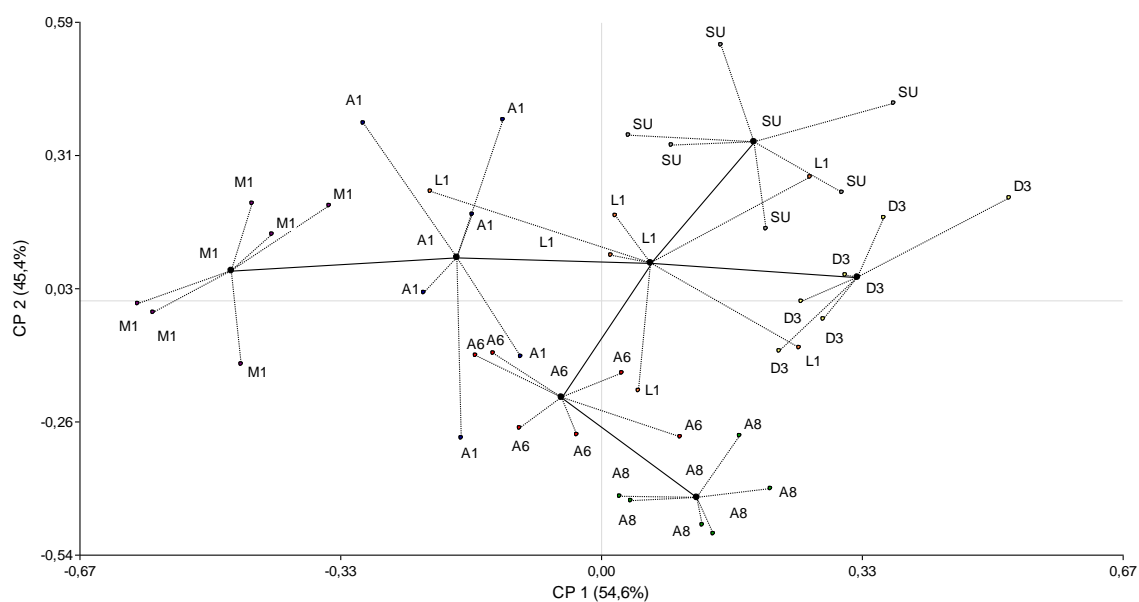


Figura 6. Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado (APG) desde la matriz de las variables morfológicas de siete genotipos híbridos de maíz en seis ambientes.

D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX 882, SU: ALBIÓN.

Análisis de procrustes generalizado a partir de las componentes principales calculadas con el modelo AMMI (para cada una de las seis variables morfológicas en los seis ambientes) y las coordenadas obtenidas del análisis de coordenadas principales

Para combinar en un mismo espacio la información brindada por marcadores morfológicos y moleculares se realizó un análisis de procrustes generalizado (APG). Previo a realizar el APG, se obtuvieron las componentes y coordenadas para cada conjunto de datos. De los datos morfológicos se obtuvieron las componentes principales (CP). Estas fueron calculadas mediante la información brindada por los resultados obtenidos con el modelo AMMI para cada una de las variables morfológicas considerando cada uno de los seis ambientes. De los datos moleculares se obtuvieron las coordenadas principales (PCO) derivadas del ACoorP.

El análisis de procrustes generalizado (APG) permitió observar un consenso de 88,6% (cociente entre el consenso y la suma de cuadrados) entre el ordenamiento producido por los marcadores moleculares y el producido por los marcadores morfológicos (de cada uno de los seis ambientes) para los siete híbridos (Cuadro 6). En la Figura 7 se observa el gráfico de dispersión de los ordenamientos individuales y de consenso entre las seis variables morfológicas, cuyas CP se obtuvieron mediante los resultados obtenidos mediante el modelo AMMI en los seis ambientes y los marcadores moleculares. Los autovalores indican que la variabilidad explicada mediante el eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso es del 53%. Los dos primeros ejes permiten explicar el 100% de la variabilidad contenida en el conjunto de variables medidas. El eje 1 separó hacia la derecha a los híbridos L1, D3, M1 y

A1 del resto de los materiales. Estos híbridos, serían los que presentan mayores valores para las variables analizadas, en todos los ambientes considerados. El genotipo D3 se ubica en el extremo de la zona positiva, mientras que A6 adquiere el mayor valor negativo. El resto se posicionaron en sectores intermedios a los mencionados. En la Figura 7 se puede observar el parecido de ciertos híbridos en las seis variables, cuando se consideran simultáneamente todos los ambientes. Tal es el caso de los genotipos SU, A8, M1 y D3 que se ubican muy cercanos entre sí. Los híbridos A6, A1 y L1, no se asocian de manera directa a estos perfiles modales, sino que lo hacen a través de A8, SU M1 y D3, respectivamente.

Cuadro 6. Suma de cuadrados del análisis de procrustes generalizado (APG) combinando información proveniente de seis variables morfológicas (RTO – DF – AL – HC – AE y EP) en cada uno de los seis ambientes (BW – BE – OC – SF– TL y ET) y 52 marcadores moleculares para siete genotipos híbridos de maíz.

	Consenso	Residuo	Total	Proporción de Consenso
Grupo 1	1,102	0,020	1,121	0,982
Grupo 2	1,098	0,021	1,119	0,981
Grupo 3	1,098	0,021	1,119	0,981
Grupo 4	1,101	0,020	1,121	0,982
Grupo 5	1,088	0,026	1,113	0,977
Grupo 6	1,098	0,021	1,119	0,981
Grupo 7	-0,383	0,670	0,287	-1,337
Total	6,200	0,800	7,000	0,886

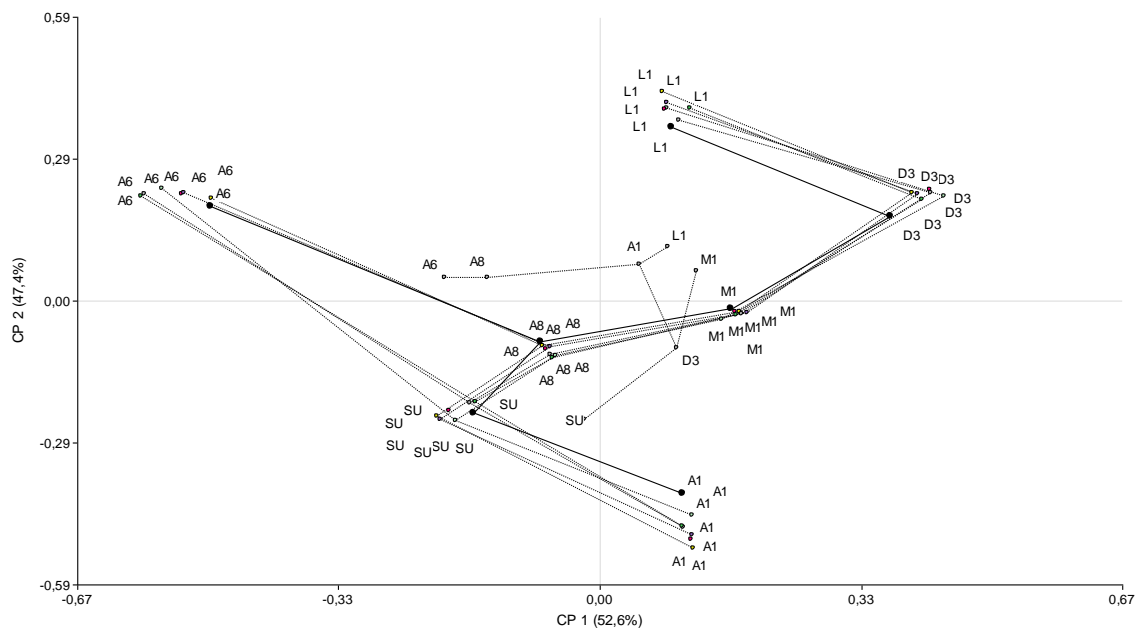


Figura 7. Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado (APG) desde la matriz de las variables morfológicas (en seis ambientes) y moleculares de siete genotipos híbridos de maíz.

D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN.

En el Anexo 12 se presentan los cuadros y las figuras con los gráficos biplot pertenecientes al análisis de procrustes generalizado (APG) con las configuraciones consenso para cada una de las variables morfológicas a partir de las CP calculadas por medio de los resultados obtenidos por el modelo AMMI y las PCO del análisis de coordenadas principales (ACoorP).

De manera general, se determinó que existe un consenso de alrededor del 70% entre el ordenamiento producido por los marcadores moleculares y el producido por las variables morfológicas.

DISCUSIÓN

En la FAV de la UNRC se realizaron diversos trabajos de investigación de caracterización y clasificación genética en maíz y en otras especies de interés, empleando las técnicas de análisis (Aiassa, 2004; Bonamico *et al.*, 2004, 2010; Fissore, 2013; Rossi, 2013).

En el presente estudio el análisis multivariado de conglomerados para los 18 híbridos de maíz permitió diferenciar los materiales según el criterio de agrupamiento criadero comercial al cual pertenecen, a excepción de los híbridos de Nidera, que se distribuyeron en distintos sub grupos, lo cual indicó su mayor variabilidad. En cuanto a la línea de corte de los dendrogramas, existen diferentes criterios, uno frecuentemente utilizado es tomar a la mitad del rango total de los valores de distancia o a un cuarto. Sin embargo muchas veces el número de grupos formado depende del conocimiento del problema y de la conveniencia en los análisis posteriores que pueden realizarse con estos grupos. En este trabajo se tomó el último criterio. Hernández *et al.* (2010) al evaluar y caracterizar líneas parentales de híbridos de maíz en tres ambientes diferentes y realizar el análisis de conglomerados, diferenciaron dos grupos que separan a los genotipos según un criterio de agrupamiento conocido, líneas dentadas y duras.

En el análisis de coordenadas principales para los 18 híbridos de maíz, un 43% de la variabilidad total fue explicada por los tres primeros ejes. En general los genotipos pertenecientes a los mismos criaderos se ubicaron próximos uno de otros, formando tres grupos. Los híbridos que más se diferenciaron fueron A6 y SU. Arnao *et al.* (2010) en un estudio de diversidad genética realizado con 14 genotipos y utilizando marcadores microsatélites, obtuvieron por medio del ACooP un porcentaje de variación similar al obtenido en el presente estudio.

En el análisis de correlación de Pearson considerando todos los ambientes en conjunto, se observó que algunos pares de variables presentaron correlación lineal significativa positiva y negativa, respectivamente. En lo que respecta al análisis particionado por ambiente, en BW, BE, SF y TL, se encontraron asociaciones lineales significativas positivas y negativas entre algunos pares de variables. Solo en OC y ET no se observó asociación estadísticamente significativa entre pares de variables. Ferraris y Couretot (2012), al realizar una caracterización y evaluación comparativa de cultivares de maíz en la localidad de Colón (Buenos Aires) en la campaña 2011/2012, hallaron para un conjunto de variables cuantitativas, que la obtención de altos rendimientos estaba asociada a un elevado número de granos m², granos/espiga y alto peso hectolítrico. También, Ruiz De Galarreta Gómez

(1999), en su trabajo de agrupación de poblaciones de maíz mediante caracteres morfológicos y parámetros ambientales, halló que las correlaciones más altas se encuentran entre los caracteres vegetativos de la planta y los de ciclo. Estos resultados, coinciden parcialmente con los encontrados en este trabajo.

En el análisis de conglomerados para siete de los híbridos de maíz evaluados, el dendrograma resultante utilizando la distancia de Jaccard ($1 - S$), permitió la formación de tres grupos. El grupo uno y dos incluye a todos los híbridos pertenecientes a los criaderos Morgan, Nidera y La Tijereta y el tercer grupo reúne a los híbridos pertenecientes a los criaderos Sursem y Monsanto, respectivamente. Además, se realizó un dendrograma resultante del análisis de conglomerados, pero utilizando la distancia de Dice. Con ellos se arribó a los mismos resultados, ya que los híbridos se agruparon de la misma manera. Resultados coincidentes fueron encontrados por Demey *et al.* (2003). Estos autores determinaron respecto a los coeficientes de correlación cofenética que independientemente de la medida de disimilitud usada, las clasificaciones por árbol no-jerárquico empleando como método de agregación Neighbor-Joining producen las estructuras de mejor ajuste, siendo la de mayor valor la estructura generada a través de la disimilitud debida al coeficiente de Jaccard. Dichos resultados muestran la importancia de encontrar la mejor relación entre las medidas de disimilitud y la técnica de agrupamiento a fin de minimizar la pérdida de información en el análisis estadístico aplicado. También, Hernández *et al.* (2010) al comparar el análisis realizado con marcadores RAPD mediante el coeficiente de distancia de Jaccard ($1-S$) y el realizado con marcadores SSR mediante el coeficiente de distancia de Nei en 14 líneas de maíz informan coincidencia en la clasificación. En ambos casos existe la tendencia de agrupar separadamente a las líneas dentadas de las duras.

En el análisis de coordenadas principales las primeras coordenadas formadas, permitieron ubicar espacialmente los grupos de híbridos de maíz que presentan menor distancia entre ellos. Las tres primeras CP explicaron el 70% de la variabilidad. Se realizó el ACoorP utilizando el coeficiente de Dice y se pudo determinar que la organización espacial de los siete híbridos de maíz es similar que la determinada mediante el coeficiente de Jaccard. En un estudio semejante llevado a cabo por Hernández *et al.* (2010) cuya finalidad fue evaluar y caracterizar líneas parentales de híbridos de maíz en tres ambientes diferentes, los resultados obtenidos no se correspondieron en su totalidad con los observados en el presente estudio en cuanto a la variación explicada por las primeras componentes. Sin embargo, en ambos trabajos se logró agrupar los materiales que presentan menor distancia entre ellos. En cuanto al ACoorP utilizando las distancias de Jaccard y Dice, la discusión coincide con lo ya mencionado para el análisis de conglomerados. Es decir, no se encontraron diferencias en el modo de agrupamiento de los híbridos con una u otra distancia.

El análisis de componentes principales resultó una técnica adecuada para reducir las dimensiones y facilitar la interpretación de la interrelación entre los caracteres, los híbridos y los ambientes tal como mencionaron Balzarini *et al.* (2008). Estos gráficos permitieron visualizar que un 64% de la variabilidad total fue explicada por el primer plano factorial (CP1 y CP2). Los híbridos que más contribuyeron a la variabilidad total fueron SU y M1 en TL, respecto de A6 y A8 en SF. Las variables morfológicas que más contribuyeron a la variabilidad total fueron AE, EP y DF. A nivel de la CP2, las variables con mayor inercia fueron RTO y LC. Zuliani *et al.* (2012), en su trabajo sobre caracterización de poblaciones nativas de maíz mediante análisis de procrustes generalizado y análisis factorial múltiple, encontraron que las variables diámetro de mazorca, granos por metro, peso y rendimiento son las que más contribuyen a la formación del primer factor. Las demás lo hacen de una manera moderada y equilibrada. En lo que se refiere al segundo factor las variables que más contribuyen a su formación son: altura de inserción de la espiga, altura de la planta, enfrentadas en el plano a ancho de grano. Todos estos resultados coinciden parcialmente con lo hallado en este trabajo.

En cuanto a la correlación entre las variables morfológicas, se observó que AL, AE y HC estaban positiva y altamente correlacionadas, mientras que otras lo hicieron negativamente. Zuliani *et al.* (2012), pudieron concluir que la realización de un ACP correspondientes a los diferentes ambientes permite visualizar en el plano las semejanzas y diferencias medias de las poblaciones en estudio, como así también las correlaciones entre las variables.

La CP2 permite diferenciar híbridos en cada uno de los ambientes. Hernández *et al.* (2010) realizó el ACP con datos de marcadores SSR en 14 líneas de maíz mediante el coeficiente de Nei en tres ambientes y observó que la CP2 separó, de manera general, las líneas dentadas de las duras con algunas pocas excepciones.

El análisis de componentes principales particionado por ambiente, para los siete híbridos comerciales de maíz y para las siete variables morfológicas no permite observar el mismo patrón de comportamiento para el conjunto total de híbridos y variables morfológicas. A excepción de cuatro de los siete genotipos. El análisis de componentes principales resultó ser una herramienta útil para separar a los híbridos en cada uno de los ambientes tal como lo mostrado por Zuliani *et al.* (2012) al observar la asociación de diferentes poblaciones nativas de maíz con rendimiento y otros caracteres morfológicos.

El APG resulta una herramienta útil para analizar el consenso de diversos tipos de matrices de datos. Fissore (2013) estudió el consenso entre el comportamiento frente a seis caracteres relacionados a podredumbre de tallo y raíz y rendimiento de 12 híbridos comerciales de maíz evaluados en las localidades de Olaeta, Papagayo y Buchardo, durante el ciclo agrícola 2008/09. En el APG realizado en este trabajo se obtuvo un consenso entre el

ordenamiento producido por todas las variables morfológicas para los siete genotipos híbridos de maíz en cada uno de los seis ambientes. En este trabajo se obtuvo un consenso relativamente bajo debido a que la mitad de los caracteres mediante los cuales fueron evaluados los híbridos presentaron interacción genotipo – ambiente estadísticamente significativa, lo cual correspondía con que el ordenamiento de los híbridos se modificó a través de los ambientes

En el análisis de procrustes generalizado a partir de las componentes principales calculadas con el modelo AMMI (para cada una de las seis variables morfológicas en los seis ambientes) y las coordenadas obtenidas del análisis de coordenadas principales con siete marcadores SSR, permitió observar que existe un consenso de 89% entre el ordenamiento producido por los marcadores moleculares y el producido por los marcadores morfológicos, de los siete híbridos en cada una de los seis ambientes. Bermejo *et al.* (2010) realizaron un APG con datos moleculares y morfológicos en un estudio de evaluación agronómica y molecular con líneas puras recombinantes (RIL) de lentejas. Con él lograron establecer una correlación entre el índice de similitud de Dice (datos del polimorfismo relacionado con la secuencia – PAS -) y la distancia Euclídea (datos morfológicos) de 0,75 lo que indica una buena correspondencia entre los ordenamientos con ambos grupos de datos. Este valor sugiere que ambos tipos de variables (morfológicas – moleculares) proporcionarían similares estimaciones sobre la variabilidad entre las RIL. Cuando se registran distintos tipos de descriptores, el análisis de procrustes generalizado (APG) resulta la metodología de análisis más adecuada (Di Rienzo y Balzarini 2003; Balzarini *et al.*, 2010) para describir la armonización o adecuación de las configuraciones provenientes de cada tipo de descriptor (Bonamico *et al.*, 2004, 2010; Zuliani *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Con el análisis de conglomerados se logró obtener un ordenamiento genotípico de los híbridos comerciales de maíz caracterizados con 52 marcadores moleculares SSR. Estos resultados coinciden con el obtenido por el ACoorP. No se halló diferencias en cuanto al modo de agrupamiento generado por el índice de similitud de Jaccard y Dice.

El ACP, permitió separar los ambientes, ordenar los híbridos dentro de cada ambiente y poner de manifiesto las interrelaciones entre las variables morfológicas consideradas. Al realizarlo particionado por ambiente, no se encontró un mismo patrón de comportamiento para el conjunto total de híbridos y variables morfológicas.

El análisis de correlación de Pearson realizado para los seis ambientes permitió encontrar correlación lineal significativa entre pares de variables. Al tomar cada uno de los ambientes por separado, en la mayoría, se encontró asociación lineal entre algunas variables, pero diferentes a lo hallado anteriormente.

En el ACP y en el análisis de correlación de Pearson no se halló coincidencia en los resultados al hacer los análisis con todos los ambientes juntos y particionado por ambiente. La interacción genotipo ambiente pudo ser la responsable de la falta de coincidencia.

El APG, resultó ser una herramienta útil para separar a los siete híbridos de acuerdo a las variables morfológicas y poner de manifiesto la estabilidad de cada uno de ellos en los diferentes ambientes. Además, permitió identificar similitudes y diferencias entre los híbridos en función a las variables morfológicas, cuyos datos fueron obtenidos de ensayos del INTA.

El APG realizado con las componentes estimadas por medio de los resultados obtenidos del modelo AMMI, permitió obtener un consenso entre los marcadores moleculares y el producido por los marcadores morfológicos (de cada uno de los seis ambientes) para los siete híbridos. Con él, se logró observar el parecido de ciertos híbridos, cuando se consideran simultáneamente todos los ambientes.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDO, G. 2012. *Cultivos y sabores de nuestra América. Autoría colectiva de la red Pro-huerta latinoamericana*. Ed. Paula Berenguer. 4-5 p.
- BECERRA, V y M. PAREDES. 2011. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. En: www.scielo.cl/scielo. Consultado: 20-12-2011.
- AIASSA, J.P. 2004. *Caracterización molecular de híbridos simples de maíz (Zea mays L.) mediante microsatélites*. Tesis. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Río Cuarto. Argentina.
- ARNAO, E.; R. PERDOMO y E. GRATEROL. 2010. Diversidad genética en cultivares de soya utilizando marcadores microsatélites en Venezuela. *Interciencia* 35: 534-538.
- BALZARINI, M. y J. DI RIENZO. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- BALZARINI, M. G.; L. GONZALEZ; M. TABLADA; F. CASANOVES; J. A. DI RIENZO y C. W. ROBLEDO. 2008. *Manual del Usuario InfoStat*. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina. 336 p.
- BALZARINI, M.; C. BRUNO; A. PEÑA; I. TEICH y J. DI RIENZO. 2010. *Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen*. 1^{ra} ed. Ed. Brujas, Córdoba; Argentina. Parte 1 y 2.
- BERMEJO, C.; V. P. CRAVERO; F. S. LÓPEZ ANIDO y E. L. COINTRY. 2010. Agronomic and molecular evaluation of recombinant inbred lines (RILs) of lentil. *J. Plant Breeding and Crop. Sci* 2(9): 280-285.
- BONAMICO, N. C.; J. P. AIASSA; M. A. IBAÑEZ; M. A. DI RENZO; D. G. DÍAZ; y J. C. SALERNO. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *RIA* 33(2): 129-144.
- BONAMICO N. C., M. G. BALZARINI, A. T. ARROYO, M. A. IBAÑEZ, D. G. DÍAZ, J. C. SALERNO, M. A. DI RENZO. 2010. Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminate analysis. *Phyton* 79: 31-38.
- BRUNO, C. y M. BALZARINI. 2010. Ordenaciones de material genético a partir de información multidimensional. *Rev. FCA UNCuyo* 42(2): 183-200.
- DEMEY, JHONNY.; A. ZAMBRANO; F. FUENMAYOR y V. SEGOVIA. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia* 28. 12.
- DILLMAN, C.; A. BAR-HEN; D. GUERIN; A. CHARCOSSET y A. MURIGNEUX. 1997. Comparison of RFLP and morphological distances between maize *Zea mays* L. inbre

- lines. Consequences for germplasm protection purposes. *Theor. Appl. Genet* 95: 92-102.
- DI RIENZO, J. A. y M. BALZARINI. 2003. Consensuando ordenaciones de material genético. *JBAG*.115.
- EL PORTAL AL MUNDO. 2011. Producción de maíz en Argentina. En: www.made-in-argentina.com/alimentos/granos. Consultado: 20-12-2011.
- EYHERABIDE, G. H. 2006. Mejoramiento genético de maíz y su trayectoria en la Argentina. En: *Maíz y nutrición, informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina. 2: 14-21.
- FERRARIS, G. N. y L. A COURETOT. 2011. Caracterización y Evaluación comparativa de cultivares de maíz en la localidad de Colón (Buenos Aires). Campaña 2011/2012. En: www.inta.gov.ar/pergamino. Consultado 06-10-2014.
- FISSORE, M. 2013. *Evaluación de híbridos de maíz por su comportamiento frente a podredumbre de tallo y raíz*. Tesis de grado, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 23-59 p.
- GABRIEL, K. R. 1971. Biplot display of multivariate matrices with application to principal components analysis. *Biometrika* 58: 453-467.
- GEAR, J. R. 2006. El cultivo de maíz en la Argentina. En: *Maíz y nutrición, informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, 2: 4-8.
- GOWER, J. C. 1975. Generalized Procrustes Analysis. *Psychometrika* 40(1): 33-51.
- HERNÁNDEZ, A.; F. SAN VICENTE y R. FIGUEROA-RUIZ. 2010 Evaluación y caracterización de líneas parentales de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) en tres ambientes de Venezuela. *Interciencia* 35: 290-298.
- LEVITUS, G. 2006. Biotecnología y maíz. En: *Maíz y nutrición, informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, 2: 73-77.
- MILBOURNE D.; R. MEYER, J. E. BRADSHAW; E. BAIRD; N. BONAR; J. PROVAN, W. POWELL y R. WAUGH. 1997. Comparison of PCR based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mej. Molecular* 3: 127-136.
- PASTOR C. 2004. Clusters Regionales de Maíz para la producción de Proteínas de Origen Animal. En: www.maizar.org.ar/documentos/clusterspastor.doc. Consultado 20/10/2012.
- PEJIC, L.; P. AJMONE-MARSAN; M. MORGANTE; V. KOVUMPLICK; P. CASTIGLIONI; G. TARAMINO y M. MOTTO. 1998. Comparative analysis of

- genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RPADs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet* 97: 1248-1255.
- ROSSI, E. 2013. *Evaluación de híbridos comerciales de maíz por su aptitud para silaje*. Tesis de grado, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 19-35 p.
- RUIZ DE GALARRETA GÓMEZ, J. I. 1999. *Agrupación de poblaciones locales de maíz (Zea mays L.) mediante caracteres morfológicos y parámetros ambientales*. Tesis doctoral, Universidad de Lérida, Lérida, España. 120 p.
- SAGPyA. 2010. En: www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/maiz/infmaiz.php#pie Consultado: 25/03/2012.
- VALADEZ, E y G. KAHL. 1999. *Categorías básicas para el análisis de marcadores genético-moleculares*. Dpto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. p: 182.
- WARBURTON, M. L.; X. XIANCHUN; J. CROSSA; J. FRANCO; A. MELCHINGER; M. FRISCH; M. BOHN y D. HOISINGTON. 2002. Genetic characterization of CIMMYT inbred lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Sci* 42: 1832-1840.
- ZOBEL, R. W., WRIGHT, M.J. y GAUCH, H.G. 1988. Statistical analysis of a yield trial. *Agron. J.* 80: 388-393.
- ZULIANI, P.; A. LAVALLE; S. J. BRAMARDI y R. DEFACIO. 2012. Caracterización de poblaciones nativas de maíz mediante análisis de procrustes generalizado y análisis factorial múltiple. *Rev. FCA UNCuyo* 44(1): 49-64-57.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN a partir de harina de semilla realizada en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Colocar 200 mg de harina en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.

Agregar 1000 µl de buffer CTBA de extracción (20 g/l CTAB: 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCL, 20 mM EDTA, preparar con agua deionizada, ajustar el pH a 8, autoclavar, guardar a 4 °C) y mezclar con vortex.

Incubar a 65 °C durante 30 min.

Centrifugar a 1200 rpm durante 10 min.

Transferir fase superior a un tubo con 400 µl de cloroformo-octanol (24-1), colocar en vortex durante 30 seg.

Centrifugar a 10.000 rpm, durante 10 min y transferir el sobranate a un tubo de 2 ml.

Agregar 2 volúmenes de buffer CTAB de precipitación (5 g/l CTAB: 0,04 m NaCl, ajustar el pH a 8, preparar con agua deionizada, autoclavar).

Incubar durante 60 min a temperatura ambiente.

Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min y descartar el sobrenadante.

Disolver el precipitado en 700 µl de C1Na 1,2 M.

Agregar 700 µl de cloroformo-octanol (24-1) y colocar en vortex durante 30 seg.

Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min hasta separación de fases y transferir la fase superior a un tubo de 2 ml.

Agregar 0,6 µl del volumen de isopropanol y mezclar suavemente por inversión.

Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min y colocar a -20 °C durante 20 min y descartar el sobrenadante.

Agregar 500 µl de etanol 70% (v/v) al tubo conteniendo el pellet.

Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min y descartar el sobrenadante.

Repetir el paso de limpieza anterior. Secar el pellet de ADN a 65 °C.

Disolver el pellet seco en 100 µl de TE (tris-HCL pH 7 EDTA 1 Mm) 10 Mm.

Colocar en vortex, centrifugar a 10.000 rpm durante 2 min y guardar a -20 °C.

Anexo 2. Componentes y cantidades de la mezcla de reacción de PCR

Reactivo	Conc. Stock	Vol. (μ l) por tubo
Agua estéril	----	12 μ l
PCRbuffer	10 X	2 μ l
MgCl ₂	25 mM	1,2 μ l
Iniciador directo	5 μ M	1 μ l
Iniciador inverso	5 μ M	1 μ l
dNTP	10 mM	0,4 μ l
<i>Taq</i> polimerasa	1,25 μ / μ l ng	0,4 μ l
ADN	50 ng/ μ l	2 μ l

Anexo 3. Programa del ciclador térmico (BIOMETRA UNO – Thermoblock).

94 °C	2 seg	
94 °C	30 seg	} 10 ciclos
66 °C -1°C/Ciclo	1 min (Δt° -1°C)	
72 °C	2 min	
94 °C	30 seg	} 20-35 ciclos
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	
100 °C	Temperatura tapa	

Anexo 4. Preparación del gel de agarosa Metaphor al 4%.

Medir 250 ml de buffer TBE (Buffer Tris-Borato-EDTA pH 8) y colocarlo en erlenmeyer de 500 ml. Llevar al freezer durante 15 min o a la heladera 3 horas (hasta que alcance 5 °C).

Introducir el magneto y poner en agitador. Agregar 10 gr de agarosa Metaphor lentamente (en forma de lluvia).

Tapar el Erlenmeyer con parafilm, agujerearlo y continuar agitando vigorosamente por otros 3 min.

Colocar el erlenmeyer en microondas 3 min a potencia máxima. Agitar para homogeneizar la agarosa. Llevar de nuevo al microondas (30 s al 80% de la potencia máxima o 20 s a potencia máxima) y agitar. Repetir tantas veces como sea necesario hasta que la solución hierva por 1 minuto. La agarosa está preparada cuando se observa que al hervir solo se producen burbujas grandes.

Una vez obtenida una solución límpida y sin burbujas, poner el erlenmeyer en el agitador magnético (velocidad intermedia) para que comience a bajar la temperatura (medir con termómetro). A los 80 °C completar el volumen de líquido a 250 ml. A los 70 °C adicionar 8 µl de bromuro de etidio. Cuando llega a 60 °C está lista para volcarla en la cama de geles, donde previamente se han colocado peines que formaran las calles de siembra.

Anexo 5. Cuadros con las matrices de correlaciones entre todas las variables morfológicas obtenidos a partir del coeficiente de correlación de Pearson, en cada uno de los ambientes.

Ambiente Barrow

	DF	AL	AE	HC	RTO	EP						
AL	0,13	n.s										
AE	0,13	n.s	0,54	n.s								
HC	0,23	n.s	0,32	n.s	-0,47	n.s						
RTO	-0,36	n.s	-0,79	*	-0,68	n.s	-0,22	n.s				
EP	-0,02	n.s	-0,51	n.s	-0,12	n.s	-0,10	n.s	0,49	n.s		
LC	0,16	n.s	0,79	*	0,15	n.s	0,51	n.s	-0,74	n.s	-0,77	*

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Ambiente Balcarce

	DF	AL	AE	HC	RTO	EP						
AL	-0,22	n.s										
AE	0,38	n.s	0,76	n.s								
HC	-0,07	n.s	-0,73	n.s	-0,79	*						
RTO	0,39	n.s	-0,05	n.s	-0,24	n.s	-0,30	n.s				
EP	0,45	n.s	-0,71	n.s	-0,39	n.s	0,14	n.s	0,16	n.s		
LC	0,07	n.s	-0,04	n.s	-0,22	n.s	0,55	n.s	-0,7	n.s	-0,15	n.s

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Ambiente Ochandío

	DF	ALT	AE	HC	RTO	EP						
AL	0,01	n.s										
AE	0,41	n.s	0,61	n.s								
HC	0,38	n.s	0,04	n.s	-0,05	n.s						
RTO	-0,49	n.s	-0,20	n.s	-0,51	n.s	-0,05	n.s				
EP	-0,72	n.s	-0,48	n.s	-0,41	n.s	-0,51	n.s	0,64	n.s		
LC	0,23	n.s	0,25	n.s	0,50	n.s	-0,41	n.s	-0,6	n.s	-0,26	n.s

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Ambiente San Francisco de Belloq

	DF	AL	AE	HC	RTO	EP						
AL	0,41	n.s										
AE	0,37	n.s	0,75	n.s								
HC	0,00	n.s	-0,03	n.s	-0,56	n.s						
RTO	-0,32	n.s	-0,22	n.s	-0,57	n.s	0,87	*				
EP	-0,67	n.s	-0,43	n.s	-0,36	n.s	-0,32	n.s	-0,04	n.s		
LC	-0,14	n.s	0,52	n.s	0,46	n.s	-0,48	n.s	-0,46	n.s	0,48	n.s

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Ambiente Tandil

	DF	AL	AE	HC	RTO	EP						
AL	0,38	n.s										
AE	0,55	n.s	0,58	n.s								
HC	-0,05	n.s	-0,39	n.s	-0,40	n.s						
RTO	0,82	*	-0,31	n.s	-0,55	n.s	0,11	n.s				
EP	-0,19	n.s	-0,63	n.s	-0,26	n.s	-0,19	n.s	0,36	n.s		
LC	0,26	n.s	-0,12	n.s	0,41	n.s	0,56	n.s	-0,44	n.s	-0,35	n.s

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

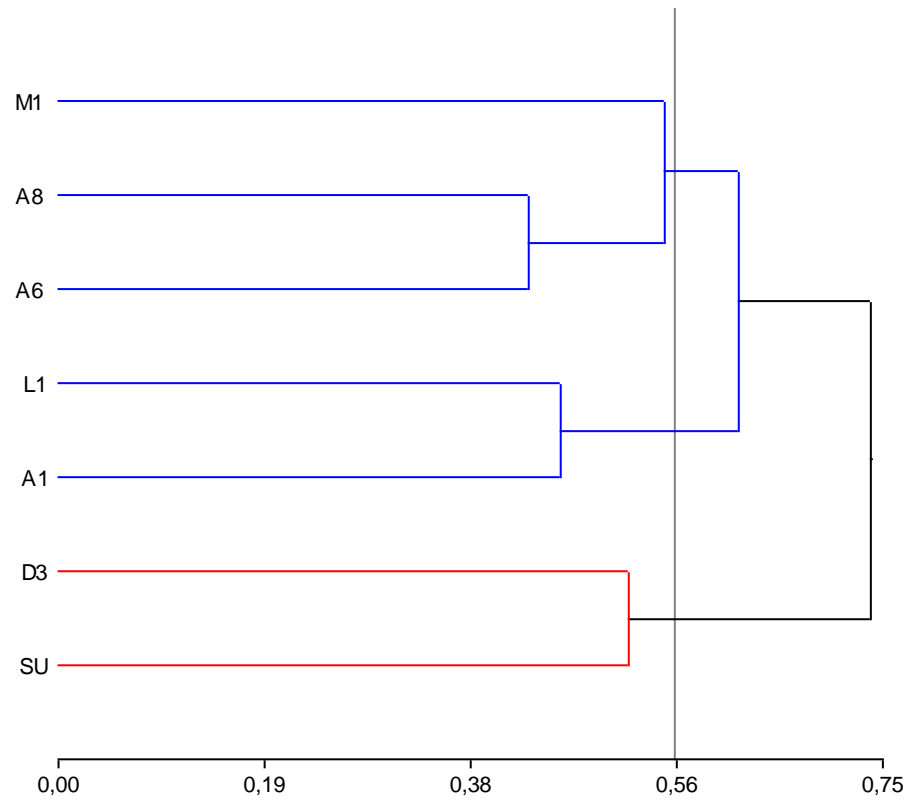
Ambiente El Triángulo

	DF	AL	AE	HC	RTO	EP						
AL	0,02	n.s										
AE	0,63	n.s	0,38	n.s								
HC	-0,34	n.s	-0,41	n.s	-0,56	n.s						
RTO	-0,64	n.s	-0,01	n.s	-0,28	n.s	0,46	n.s				
EP	0,24	n.s	-0,42	n.s	0,21	n.s	-0,39	n.s	-0,33	n.s		
LC	0,56	n.s	0,07	n.s	0,24	n.s	0,43	n.s	-0,34	n.s	-0,26	n.s

* =correlación significativa con un nivel de significancia menor a 0,05; n.s.= no significativo.

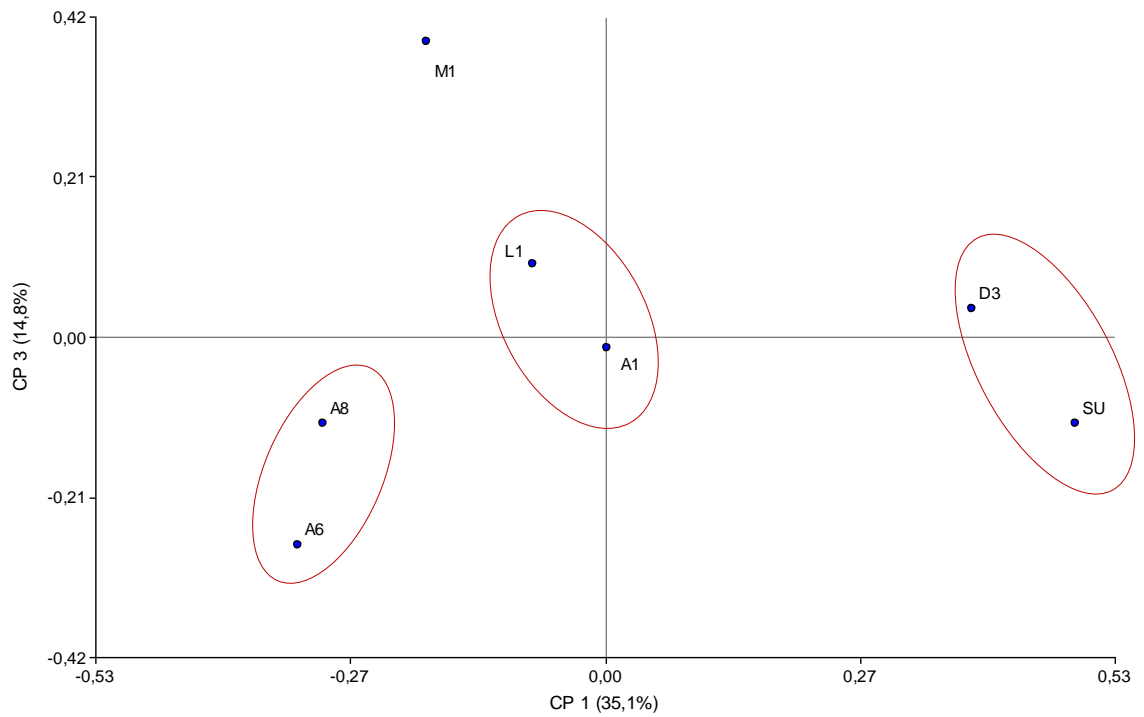
RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Anexo 6. Dendrograma obtenido a partir de la matriz de distancia basada en el índice de similitud de Dice, con datos de marcadores moleculares SSR en siete genotipos híbridos de maíz.



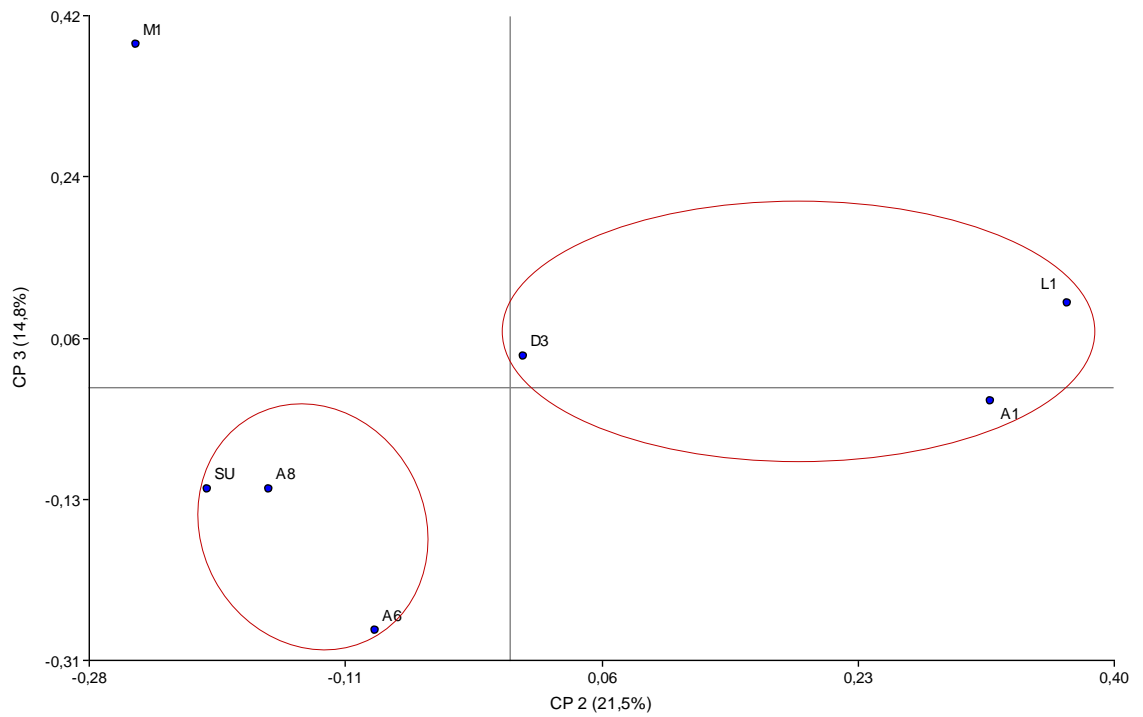
D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN.

Anexo 7. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de siete genotipos híbridos de maíz mediante el coeficiente de Jaccard. CP1 y CP3: Coordenada principal uno y tres



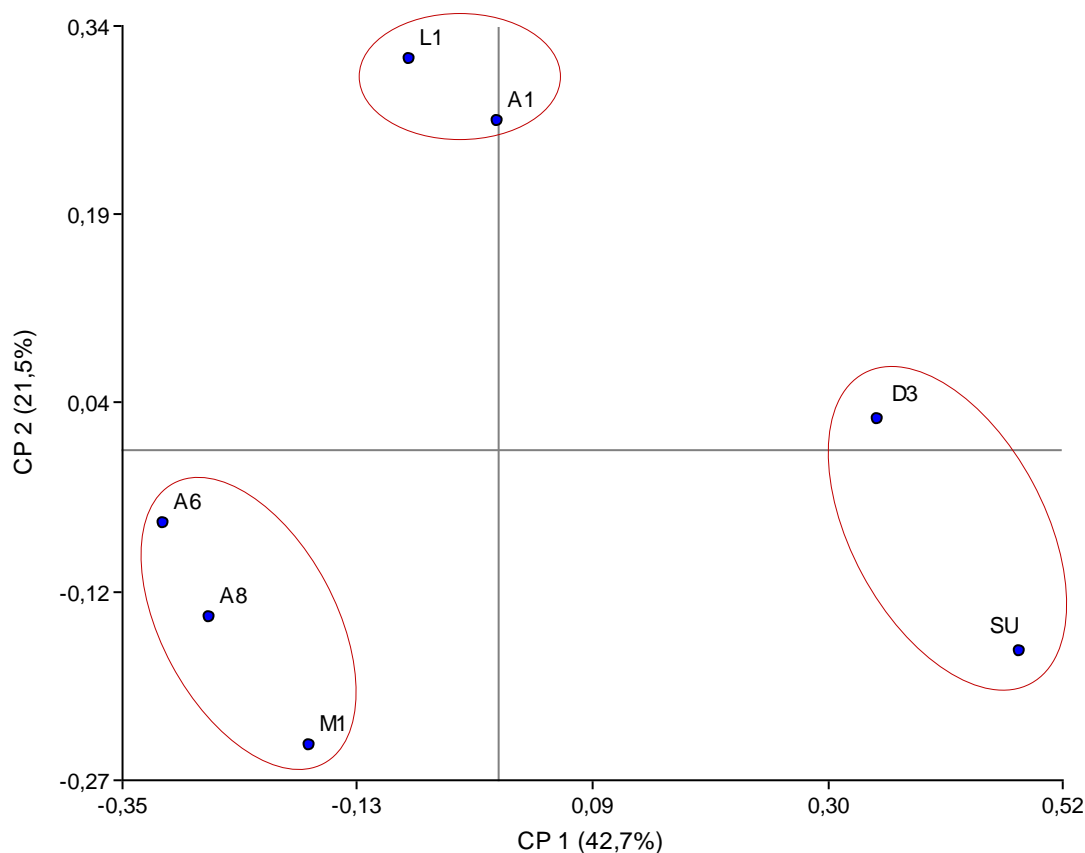
D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN

Anexo 8. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con variables moleculares de marcadores SSR para un conjunto de siete genotipos híbridos de maíz mediante el coeficiente de Jaccard. CP2 y CP3: Componente principal dos y tres.



D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN.

Anexo 9. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con datos de marcadores moleculares SSR de los siete genotipos híbridos de maíz mediante el coeficiente de Dice. CP1 y CP2: Componente principal uno y dos.



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX 882, SU: ALBIÓN.

Anexo 10. Autovectores (e1 y e2) de cada variable en el análisis de componentes principales.

Variables	e1	e2
LC	0,05	-0,44
DF	-0,39	-0,37
AL	0,46	0,21
AE	0,50	-0,01
HC	0,46	-0,32
RTO	0,12	0,63
EP	-0,39	0,39

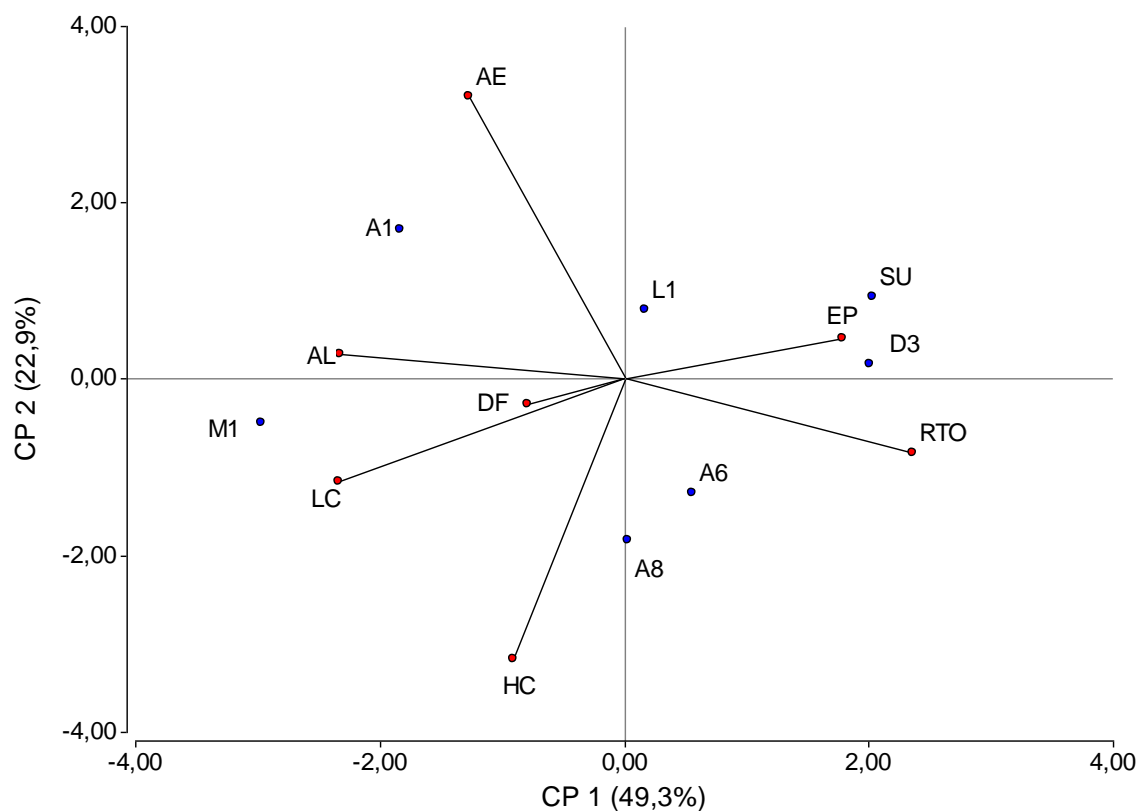
RTO: Rendimiento, DF: Días de emergencia a floración, AL: Altura, IE: Altura inserción de espiga, HC: Humedad a cosecha, EP: Relación espiga/planta, LC: Longitud de ciclo.

Anexo 11. Cuadros con los datos de los autovectores (e1 y e2) para cada una de las variables morfológicas y los gráficos biplot del análisis de componentes principales (ACP) para cada uno de los ambientes.

Barrow

Variables	e1	e2
LC	-0,49	-0,24
DF	-0,17	-0,06
AL	-0,49	0,06
AE	-0,27	0,67
HC	-0,19	-0,67
RTO	0,50	-0,17
EP	0,38	0,10

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

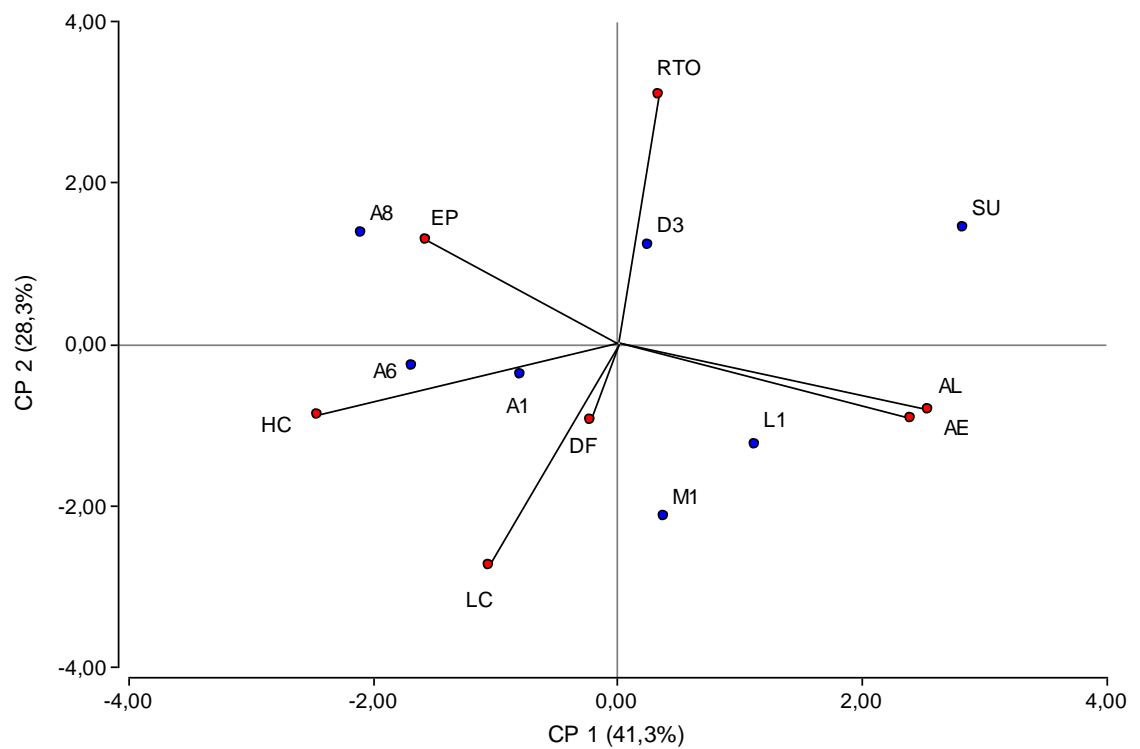


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX 882, **SU:** ALBIÓN, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Balcarce

Variables	e1	e2
LC	-0,23	-0,59
DF	-0,05	-0,20
AL	0,54	-0,17
AE	0,51	-0,20
HC	-0,52	-0,19
RTO	0,07	0,66
EP	-0,34	0,27

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **IE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

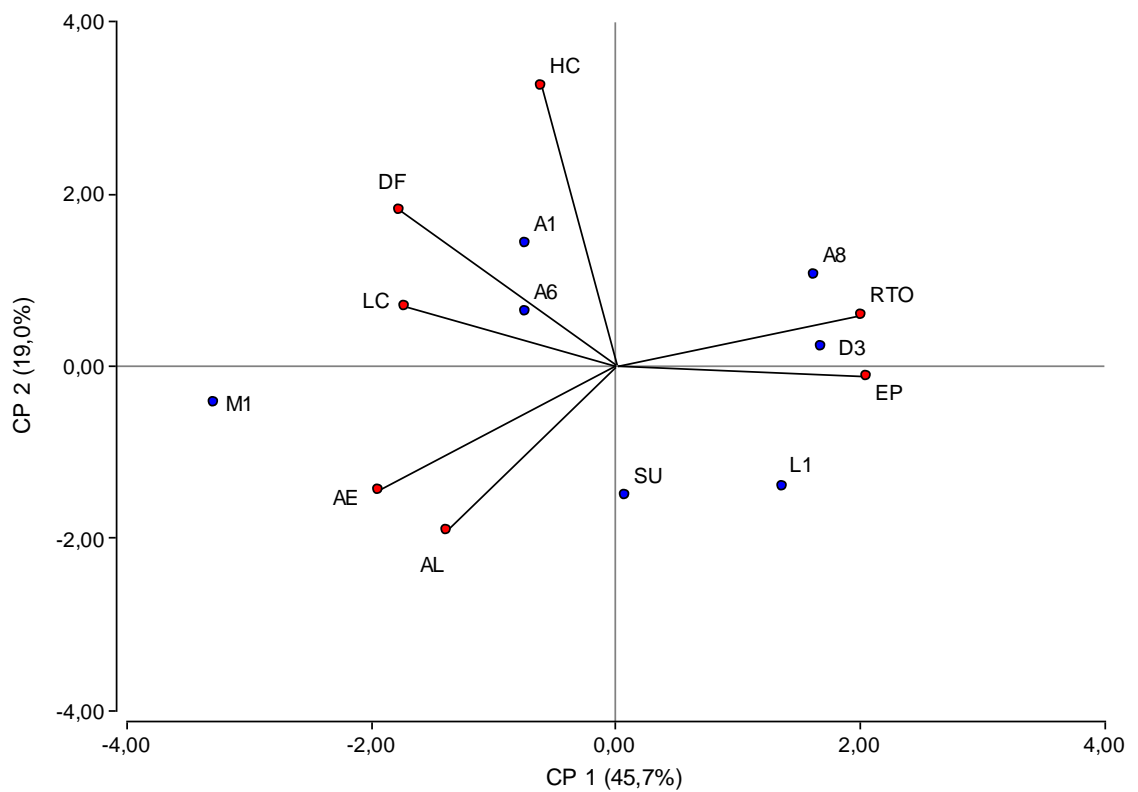


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M 10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX882, **SU:** ALBION, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Ochandio

Variables	e1	e2
LC	-0,38	0,15
DF	-0,39	0,40
AL	-0,31	-0,42
AE	-0,43	-0,32
HC	-0,13	0,72
RTO	0,45	0,13
EP	0,46	-0,03

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

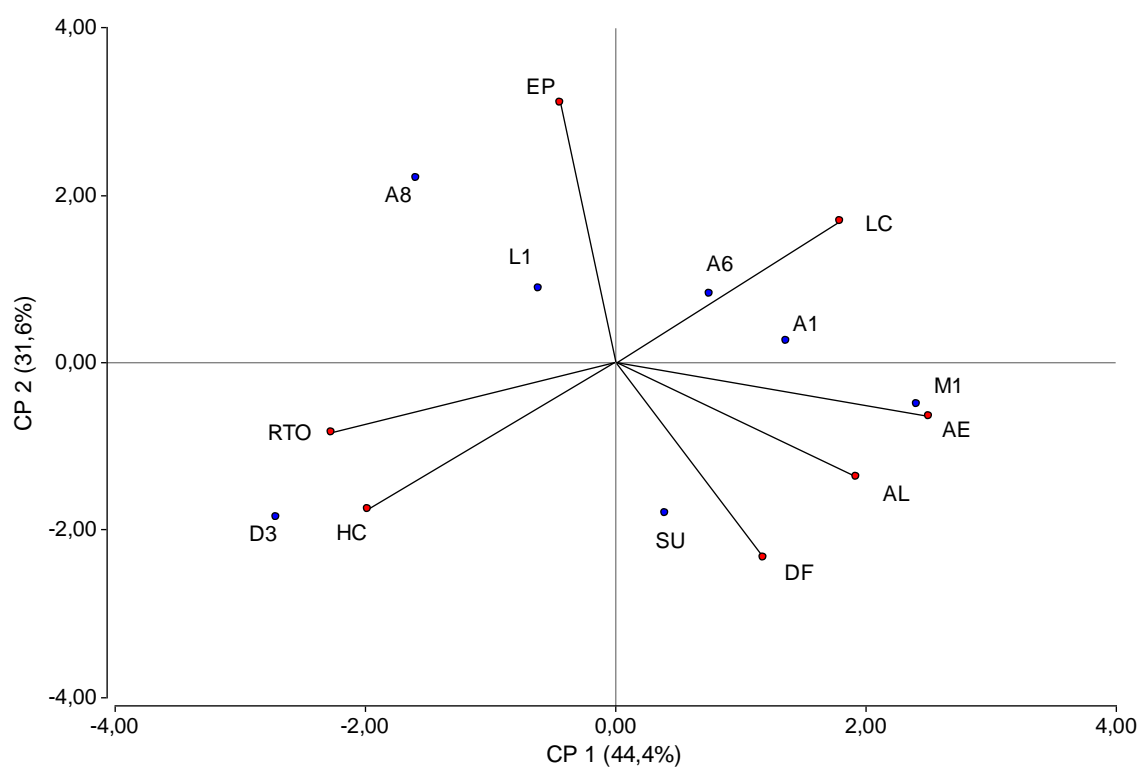


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M 10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX882, **SU:** ALBION, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

San Francisco de Belloq

Variables	e1	e2
LC	0,37	0,34
DF	0,24	-0,48
AL	0,39	-0,28
AE	0,51	-0,13
HC	-0,40	-0,36
RTO	-0,46	-0,17
EP	-0,09	0,63

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

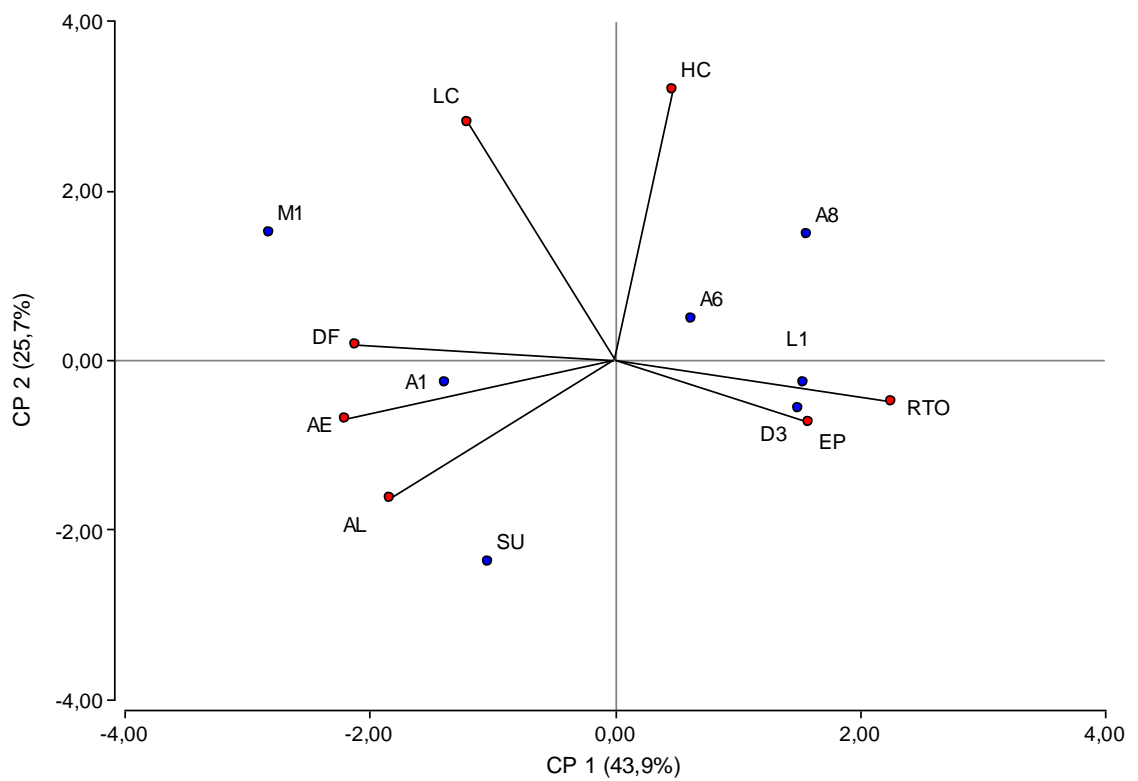


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M 10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX882, **SU:** ALBION, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Tandil

Variables	e1	e2
LC	-0,26	0,60
DF	-0,45	0,04
AL	-0,39	-0,35
AE	-0,47	-0,15
HC	0,10	0,68
RTO	0,48	-0,10
EP	0,34	-0,16

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo

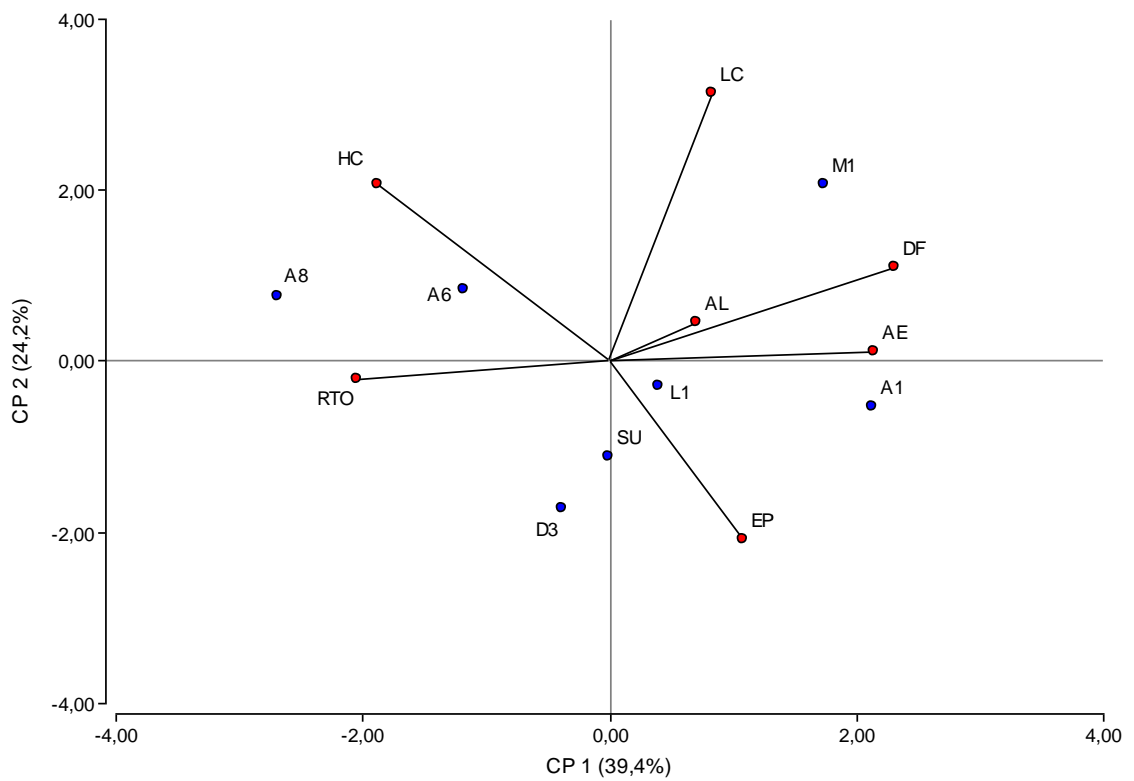


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M 10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX882, **SU:** ALBION, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

El Triángulo

Variables	e1	e2
LC	0,19	0,70
DF	0,52	0,25
AL	0,16	0,10
AE	0,48	0,02
HC	-0,42	0,46
RTO	-0,46	-0,05
EP	0,24	-0,47

RTO: Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **IE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo

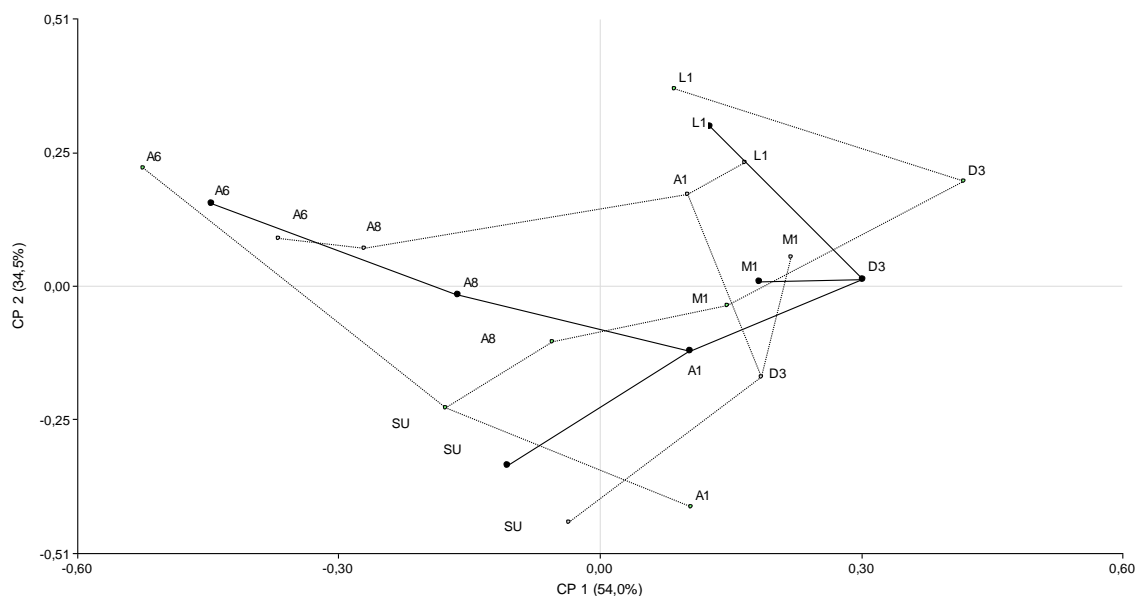


D3: DK 682 MG, **L1:** LT C 271 MG, **M1:** MORGAN M 10, **A1:** AX 828, **A6:** AX 840, **A8:** AX882, **SU:** ALBION, **RTO:** Rendimiento, **DF:** Días de emergencia a floración, **AL:** Altura, **AE:** Altura inserción de espiga, **HC:** Humedad a cosecha, **EP:** Relación espiga/planta, **LC:** Longitud de ciclo.

Anexo 12. Suma de cuadrados del análisis de procrustes generalizado (APG) combinando información proveniente de cada una de las variables morfológicas (RTO, HC, DF, AL, AE, EP) en seis ambientes (BW, BE, OC, SF, TL y ET) y los tres ejes provenientes del análisis de coordenadas principales con los marcadores de siete genotipos híbridos de maíz (D3, L1, M1, A1, A6, A8, SU).

Rendimiento

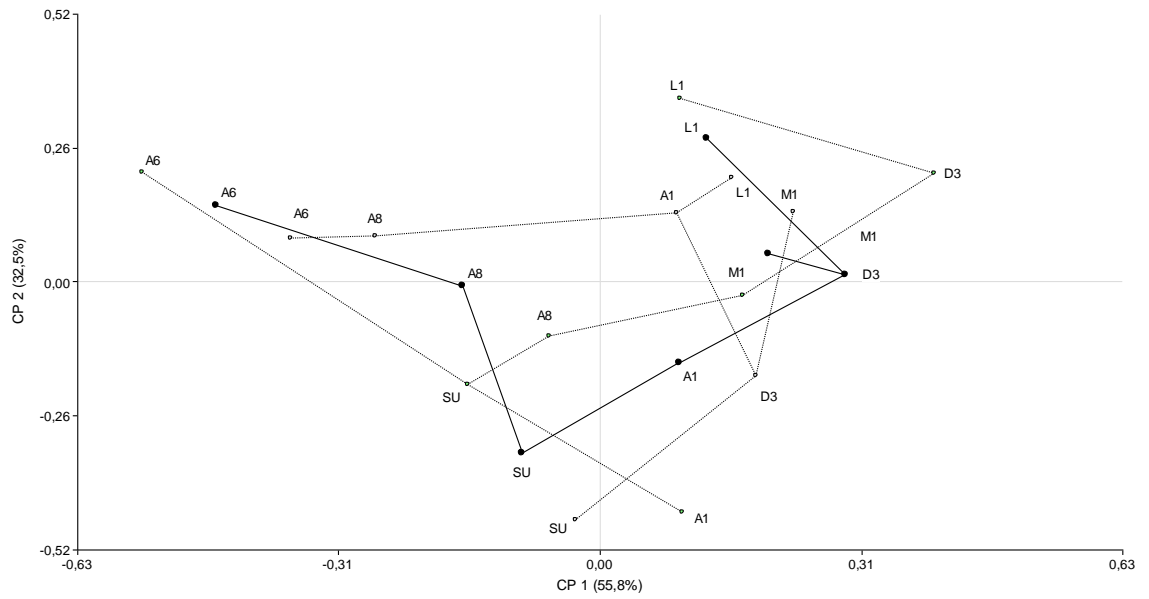
	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,723	0,277	1,000	0,723
Grupo2	0,723	0,277	1,000	0,723
Total	1,447	0,553	2,000	0,723



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.

Humedad a cosecha

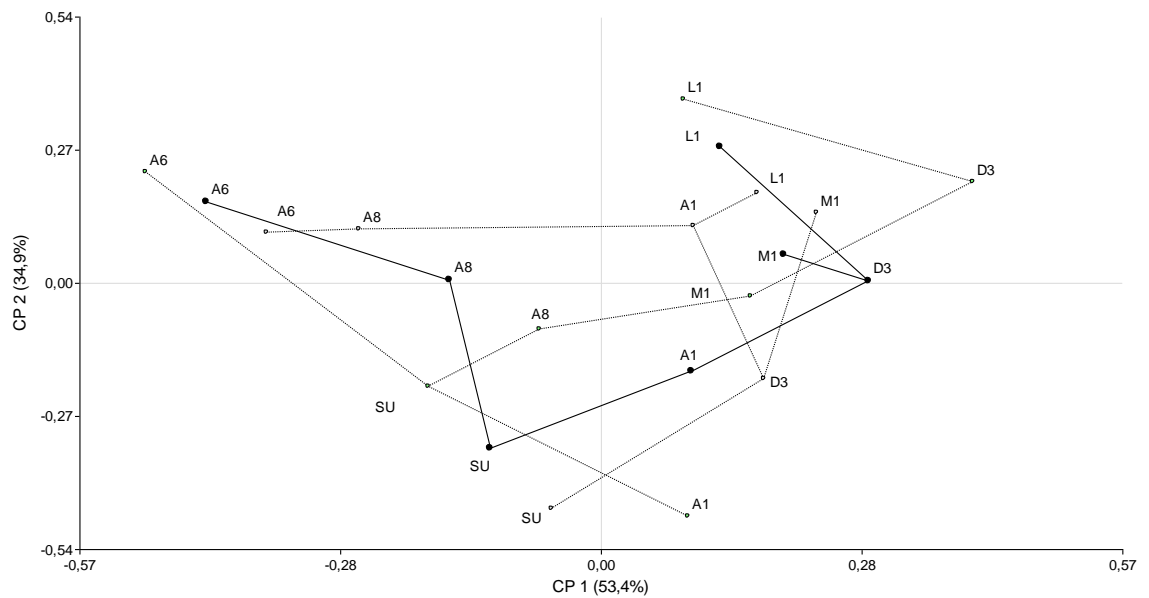
	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,717	0,283	1,000	0,717
Grupo2	0,717	0,283	1,000	0,717
Total	1,434	0,566	2,000	0,717



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.

Días de emergencia a floración

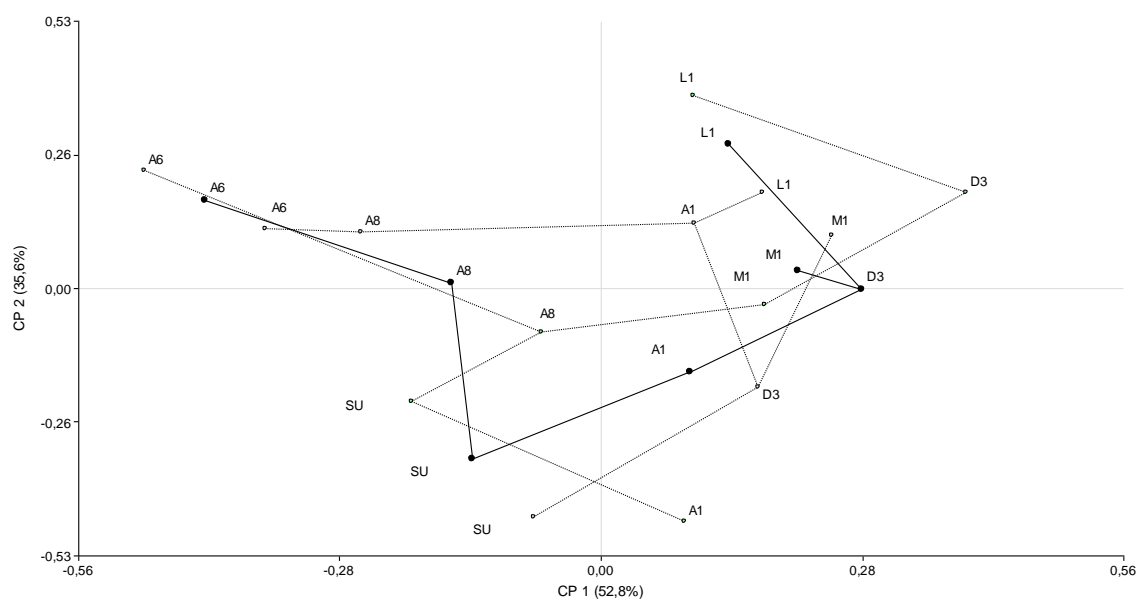
	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,712	0,288	1,000	0,712
Grupo2	0,712	0,288	1,000	0,712
Total	1,424	0,576	2,000	0,712



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.

Altura

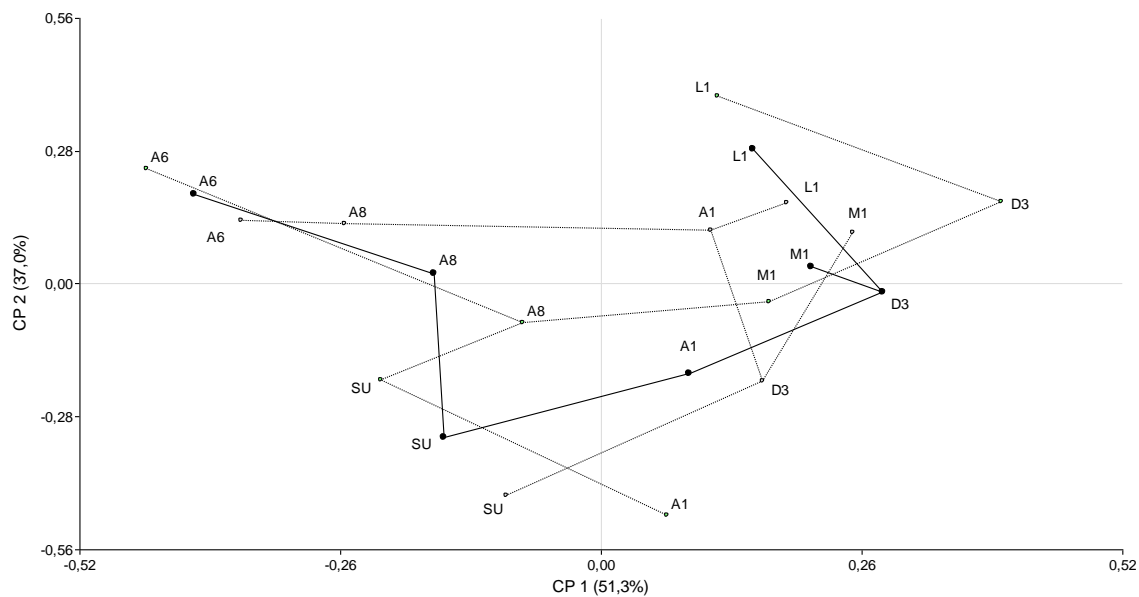
	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,718	0,282	1,000	0,718
Grupo2	0,718	0,282	1,000	0,718
Total	1,437	0,563	2,000	0,718



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.

Altura de inserción de espigas

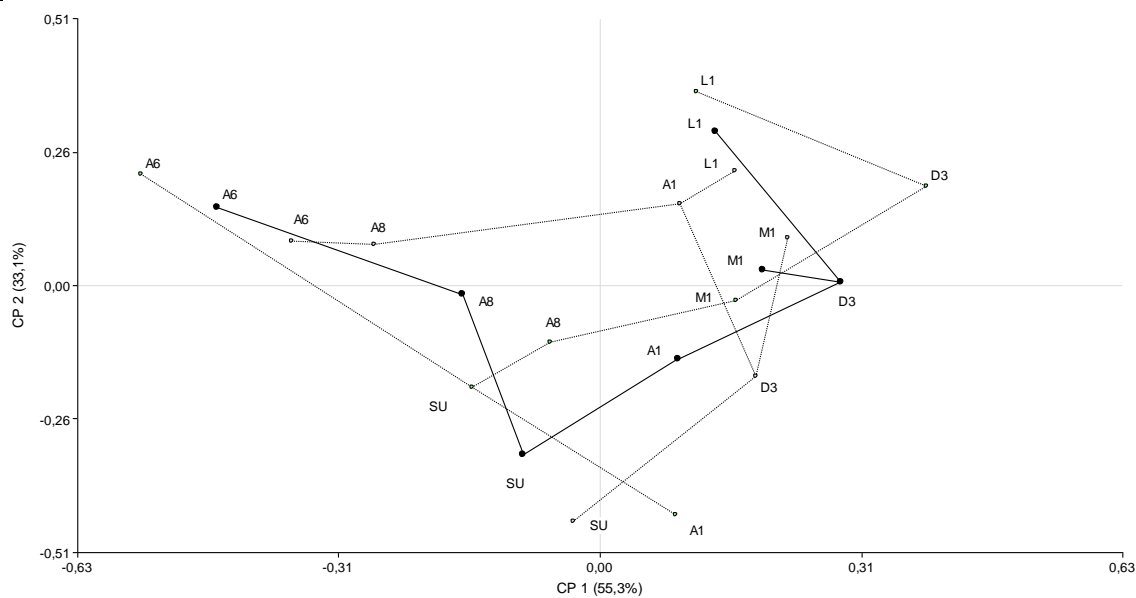
	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,710	0,290	1,000	0,710
Grupo2	0,710	0,290	1,000	0,710
Total	1,420	0,580	2,000	0,710



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.

Relación espiga planta

	Consenso	Residuo	Total	Proporción de. Consenso
Grupo1	0,719	0,281	1,000	0,719
Grupo2	0,719	0,281	1,000	0,719
Total	1,439	0,561	2,000	0,719



D3: DK 682 MG, L1: LT C 271 MG, M1: MORGAN M 10, A1: AX 828, A6: AX 840, A8: AX882, SU: ALBION.