

Tesis Doctoral

# Variaciones fenotípicas y poblacionales entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.) y sus posibles bases genéticas

Laserna, María Paula

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Laserna, María Paula. (2012). Variaciones fenotípicas y poblacionales entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.) y sus posibles bases genéticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Laserna, María Paula. "Variaciones fenotípicas y poblacionales entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.) y sus posibles bases genéticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Variaciones fenotípicas y poblacionales entre híbridos  
convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.) y  
sus posibles bases genéticas**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de las Ciencias Biológicas

**María Paula Laserna**

Director de Tesis: Gustavo Ángel Maddonni

Consejero de estudios: Sara Maldonado

Lugar de trabajo: Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía, Universidad de  
Buenos Aires

Buenos Aires, 2012

# Variaciones fenotípicas y poblacionales entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.) y sus posibles bases genéticas

## Resumen

El uso de híbridos de maíz transgénicos (Bt, RR, Bt-RR) ha simplificado el manejo de los cultivos, debido a un control efectivo de plagas y malezas. Los efectos de la inserción de los transgenes sobre el comportamiento de los híbridos de maíz no están completamente documentados, especialmente sin la incidencia de adversidades bióticas. Los objetivos de esta tesis fueron (i) establecer las posibles diferencias en fenología, crecimiento y rendimiento entre un híbrido de maíz no transgénico y sus versiones transgénicas (híbridos Bt, híbridos RR e híbridos Bt-RR) y entre las versiones transgénicas de otro híbrido; (ii) analizar el impacto del aumento de la densidad poblacional sobre la variabilidad fenotípica de los diferentes rasgos en los distintos genotipos; (iii) establecer las diferencias genéticas existentes entre las distintas versiones dentro de cada grupo de híbridos; y (iv) relacionar la variabilidad genética entre las plantas de una misma versión con la variabilidad fenotípica observada en los distintos rasgos. Los experimentos se llevaron a cabo en el campo experimental de la FA-UBA, durante el período 2008-2009 (Exp 1), 2009-2010 (Exp 2) y 2010-2011 (Exp 3). Se cultivaron las distintas versiones de dos grupos de híbridos (DK747 y DK190) en dos densidades de siembra contrastantes (6 y 12 pl m<sup>-2</sup> en Exp 1 y Exp 2) y con distinto espaciamiento entre las plantas de la hilera de siembra (Exp3). Todos los experimentos fueron regados y conducidos sin limitaciones de nutrientes, con controles químicos y mecánicos de malezas y de plagas. En las dos densidades de siembra, se registró variabilidad fenotípica de diferentes rasgos entre las versiones de un mismo grupo de híbridos (e.g. tasas de crecimiento, partición de biomasa a la espiga, TT a floración). También se describieron diferencias en la respuesta de la variabilidad fenotípica de algunos rasgos (e.g. rendimiento y tasa de crecimiento de la espiga) frente al aumento de presión de competencia, indicador de diferencias entre las versiones en la tolerancia a la alta densidad de

siembra. Por último, se encontraron diferencias genéticas entre las versiones del híbrido DK747 y entre las plantas de una misma versión, siendo la versión convencional la más variable, y la versión Bt-RR la menos variable. La ubicación de los SNP variables en cada una de las versiones permitió inferir que la variabilidad podría deberse a heterocigosis residual en las líneas parentales. Algunos de los estimadores de la variabilidad fenotípica pudieron relacionarse con la variabilidad genética (e.g. el CV del NGP, la amplitud de la BT y el coeficiente de asimetría de la  $TCP_{PC}$ ), aunque resta establecer la bases eco-fisiológicas determinantes de la variabilidad.

Palabras clave: maíz, híbridos convencionales, híbridos transgénicos, variabilidad fenotípica, variabilidad genética

# Phenotypic and population variations between non- transgenic and transgenic maize hybrids (*Zea mays* L.) and their possible genetic basis

## **Abstract**

The use of transgenic maize hybrids (Bt, RR, Bt-RR) has simplified crop management because of an effective control of pests and weeds. The effects of the transgenes insertion on the performance of maize hybrids are not well documented, especially without the incidence of biotic adversities. The objectives of this thesis were (i) to establish the differences in phenology, growth and yield between non-transgenic maize hybrid versions and its transgenic versions (Bt hybrids, RR hybrids and Bt RR hybrid ) and among transgenic versions of another hybrid, (ii) to analyze the impact of increased population density on the phenotypic variability of several traits of the different genotypes, (iii) to establish the genetic differences among versions of each group of hybrids, and (iv) to relate the genetic variability among plants of a genotype with the phenotypic variability of several traits. The experiments were carried out in the experimental field of the FA-UBA, during 2008-2009 (Exp 1), 2009-2010 (Exp 2) and 2010-2011 (Exp 3). Different versions of two groups of hybrids (DK747 and DK190) were cultivated at two contrasting plant population densities (6 and 12 pl m<sup>-2</sup> in Exp 1 and Exp 2) and with different spacing between plants along the rows (Exp3). All experiments were irrigated and conducted without nutrients limitations, with chemical and mechanical control of weeds and pests. At both plant densities, there were phenotypic variations of some traits among versions of the same group of hybrids (e.g. plant growth rate, biomass partitioning to the ear, time to flowering). Some versions also exhibited different phenotypic variability of some traits (e.g. grain yield and ear growth rate around female flowering) as competition was increased, i.e. an indicator of the tolerance to crowding degree of each genotype. Finally, genetic differences among versions of the DK747 and between plants of the same version were detected, resulting the non- transgenic DK747 the most variable, and

the DK747MGRR, the less variable. The location of the variable SNP in each version let us infer that genetic variability is probably due to residual heterozygosity in the parental lines. Some of the estimators of the phenotypic variability could be related to genetic variability (e.g. the CV of the kernel number per plant, the amplitude of the total biomass and the skewness of plant growth rate around the critical period). Physiological bases of inter-plant variability were not determined.

Key words: maize, non- transgenic hybrids, transgenic hybrids, phenotypic variation, genetic variation

## Agradecimientos

- A Gustavo Maddonni, quien me dirigió en este trabajo, por darme la oportunidad de realizar la tesis con él, por su paciencia, ayuda y apoyo durante el desarrollo del mismo.
- A Cesar López, mi co- director de beca, por su paciencia, ayuda y apoyo durante el desarrollo del proyecto.
- A todos los que colaboraron con mis ensayos a campo: Juan Rattalino, Luis Mayer, María Rossini, Eugenia Munaro, Renata Cantoro, Ignacio Alzueta, Guillermo García, Román Serrago, Gabriel Tinghitella, Walter Tanaka, Germán Wies, Magalí Nico, Salvador Incógnito, Damián Sammaro, Alejandra Seco, Candela Kremzky.
- A todos los que me ayudaron en el laboratorio en Buenos Aires: Renata Cantoro, Verónica Rodríguez, Gabriela Mattera, Adriana Riva, Vanesa Gaido.
- A todos los que colaboraron conmigo en el laboratorio en INTA Pergamino: Ana Rosa Schlatter, Carla Delucchi, Viviana Decker, Marcelo Toledo, Cecilia Mandolino.
- A quienes me ayudaron con el manejo de herramientas bioinformáticas: Sabrina Sánchez y Leonardo Storani.
- A toda la gente de las cátedras de Cereales, Cultivos Industriales y Producción Vegetal de la FA-UBA.
- A María Otegui, por su apoyo y aportes, y por compartir habitaciones conmigo en los congresos.
- A Ricardo Ruiz por su ayuda en materia de estadística.
- A mis amigas de siempre: Dany, Vicky, Ceci y Juli.
- A mis amigos de la FCEyN: Andre, Cel, Delfi, Lula, Jime, Sole y Santi.
- A mi mamá, a mi papá, y a mi hermana por creer en mí y apoyarme.
- A Leo, por apoyarme y alentarme siempre, especialmente en momentos difíciles.

## Índice general

<u>Contenido</u>	<u>página</u>
Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xi
Abreviaturas utilizadas	xii
CAPÍTULO 1: Introducción	1
1.1. Introducción general	2
1.1.1. Generalidades del cultivo de maíz	2
1.1.2. Bases Eco- fisiológicas de la determinación del rendimiento en maíz	7
1.1.3. Variabilidad poblacional en el cultivo de maíz	8
1.1.4. Variabilidad genética	11
1.2. Objetivos e hipótesis	12
1.2.1. Objetivo general	12
1.2.2. Objetivos específicos	13
1.2.3. Hipótesis	13
CAPÍTULO 2: Variaciones fenotípicas entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	14
2.1. Introducción	15
2.2. Materiales y métodos	17
2.2.1. Diseño experimental	17
2.2.2. Registro de eventos fenológicos y estimación de la biomasa de las plantas	18
2.2.3. Crecimiento de las plantas, partición de biomasa y fijación de granos	22
2.2.4. Análisis de datos	23
2.3. Resultados	25
2.3.1. Crecimiento de las plantas	25
2.3.2. Dinámica de la floración masculina (antesis) y femenina ( <i>silking</i> ) e intervalo antesis- <i>silking</i> (ASI)	27
2.3.3. Partición de biomasa y crecimiento de la espiga	28
2.3.4. Rendimiento por planta, componentes del rendimiento, y relación entre el número de granos y el crecimiento de la planta y de la espiga alrededor del período crítico	32
2.4. Discusión	35
2.5. Conclusiones	40

<u>Contenido</u>	<u>página</u>
CAPÍTULO 3: Comparación de la variabilidad fenotípica en híbridos convencionales y transgénicos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	41
3.1. Introducción	42
3.2. Materiales y métodos	43
3.2.1. Cuantificación de la variabilidad fenotípica a partir del CV y su respuesta al estrés por luz	43
3.2.2. Cuantificación de la variabilidad fenotípica a partir de descriptores estadísticos poblacionales	45
3.3. Resultados	46
3.3.1. Variabilidad fenotípica (cuantificada con el CV) en híbridos de maíz y su respuesta a la presión de competencia	46
3.3.2. Estudio poblacional de la variabilidad fenotípica	51
3.3.2.1. Rasgos del crecimiento	51
3.3.2.2. Rasgos del desarrollo y del rendimiento	55
3.4. Discusión	62
3.5. Conclusiones	68
CAPÍTULO 4: Estudio de la variabilidad genética dentro y entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	70
4.1. Introducción	71
4.2. Materiales y métodos	74
4.2.1. Extracciones de ADN y conformación de bulks	74
4.2.2. Condiciones de PCR	75
4.2.3. Visualización de los resultados	75
4.2.4. Elección de los microsatélites	76
4.2.5. Localización de los eventos MON810 y NK603 en los híbridos DK747 y DK190	77
4.2.6. Estudio de marcadores SNP	78
4.2.7. Estimación de la variabilidad genética	80
4.3. Resultados	82
4.3.1. Variabilidad genética a través del estudio de microsatélites	82
4.3.2. Localización de los eventos transgénicos	82
4.3.3. Variabilidad genética alrededor del inserto	88

<u>Contenido</u>	<u>página</u>
4.3.4. Patrón de SNP: comparación de la variabilidad entre plantas dentro de cada versión	90
4.3.5. Patrones de SNP consistentes entre grupos de plantas dominantes y dominadas	92
4.3.6. Ubicación de los SNP variables	93
4.4. Discusión	96
4.5. Conclusiones	101
CAPÍTULO 5: Discusión general, implicancias para futuras investigaciones y aplicaciones futuras	102
5.1. Discusión general	103
5.2. Implicancias para futuras investigaciones y aplicaciones futuras	114
CAPÍTULO 6: ANEXO	116
Bibliografía	126

## Índice de figuras

<u>Contenido</u>	<u>página</u>
<b>Figura 1.1.</b> Evolución de los rendimientos medios nacionales de maíz (a) y relaciones entre la producción nacional de maíz con la superficie cultivada (b) y los rendimientos medios por hectárea (c).	3
<b>Figura 1.2.</b> Impacto de períodos de déficit hídrico en distintas etapas ontogénicas del cultivo de maíz sobre el número de granos y el peso de los granos.	6
<b>Figura 1.3.</b> Rendimiento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de maíz en función del coeficiente de variación (CV) del rendimiento por planta.	11
<b>Figura 2.1:</b> Relaciones entre (i) número de granos de la espiga apical ( $\text{NGP}_{\text{EA}}$ ) y tasa de crecimiento de la planta durante el período crítico ( $\text{TCP}_{\text{PC}}$ ) (a, d), (ii) tasa de crecimiento de la espiga durante el período crítico ( $\text{TCE}_{\text{PC}}$ ) y $\text{TCP}_{\text{PC}}$ (b, e) y (iii) $\text{NGP}_{\text{EA}}$ y $\text{TCE}_{\text{PC}}$ (c, f) del DK747 y sus versiones transgénicas (a, b y c) y de las versiones transgénicas del DK190 (d, e y f).	29
<b>Figura 3.1.</b> Relaciones entre el coeficiente de variación (CV) de la $\text{TCP}_{\text{PC}}$ (a, e), $\text{TCE}_{\text{PC}}$ (b, f), $\text{NGP}$ (c, g) y Rinde (d, h) y sus respectivos valores medios, para los híbridos DK747 (a, b, c, d) y DK190 (e, f, g, h).	49
<b>Figura 3.2.</b> Distribución de frecuencias de las $\text{TCE}_{\text{PC}}$ para los híbridos del grupo DK747 (a) y DK190 (b) en $D_6$ y $D_{12}$ .	53
<b>Figura 3.3.</b> Distribución de frecuencias de las rindes para los híbridos del grupo DK747 (a) y DK190 (b) en $D_6$ y $D_{12}$ .	59
<b>Figura 4.1.</b> Distribuciones de frecuencias de biomasa total en $R_6$ de las poblaciones DK747, DK747MG, DK747RR y DK747MGRR en $D_{12}$ .	79
<b>Figura 4.2.</b> Productos de amplificación de algunos de los MSAT, visualizados en geles de poliacrilamida.	84
<b>Figura 4.3.</b> Resultados de la PCR para los pares de primers (a) Mon7.8 forward + reverse (extremo 5' de la inserción), (b) mon ins for + mon gen	

rev. (extremo 3' de la inserción), (c) Mon9.10 forward + reverse (extremo 3' de la inserción).	86
<b>Figura 4.4.</b> Resultados de la PCR para el par de primers NK5' F+R.	88
<b>Figura 4.5.</b> Patrón de microsatélites cercanos a la inserción del transgén Bt.	89
<b>Figura 4.6.</b> Número de SNP variables y no variables entre los individuos de las poblaciones de cada una de las versiones del DK747.	91
<b>Figura 4.7.</b> Número de SNP variables y no variables entre las plantas dominantes (D), medias (m) y dominadas (d) de las poblaciones dentro de cada versión del DK747.	92
<b>Figura 4.8.</b> Distribución de los SNP variables (n= 4493) entre los 48 individuos de la población conformada por las cuatro versiones del DK747.	93
<b>Figura 4.9.</b> Representación esquemática de los cromosomas de maíz, indicando las regiones variables más importantes para cada versión particular y las compartidas entre versiones.	95
<b>Figura 5.1.</b> Relación entre los CV (a), la amplitud de las distribuciones poblacionales (b) y el coeficiente de asimetría (c) con el número de SNP variables, para el conjunto de versiones del DK747.	111

## Índice de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Parámetros de los modelos alométricos utilizados para estimar: (i) biomasa total de las plantas (g) durante el período previo a <i>silking</i> ( $V_3-R_1$ para los Exp <sub>1</sub> y Exp <sub>2</sub> , $V_{16}-R_1$ para el Exp <sub>3</sub> ), (ii) biomasa vegetativa de las plantas (g) luego de 15 días desde <i>silking</i> ( $R_2$ ), y (iii) biomasa de las espigas (g) en <i>silking</i> ( $R_1$ ) y 15 días luego de <i>silking</i> ( $R_2$ ).	20
<b>Tabla 2.2.</b> Tasas de crecimiento de las plantas durante el período vegetativo ( $TCP_V$ ), el período reproductivo temprano ( $TCP_{RT}$ ) y el período crítico ( $TCP_{PC}$ ), tasas de crecimiento de las espigas durante el período crítico ( $TCE_{PC}$ ), partición de biomasa hacia la espiga durante el período crítico ( $PBE_{PC}$ ), partición de biomasa hacia la espiga en madurez fisiológica ( $BE \cdot BT^{-1}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos por planta (NGP), Rinde, peso de grano, eficiencia reproductiva (ER), tiempo térmico hasta anthesis (TT anthesis), tiempo térmico hasta <i>silking</i> (TT <i>silking</i> ) e intervalo anthesis- <i>silking</i> (ASI) de los híbridos (H) DK747 y sus versiones transgénicas, y las versiones transgénicas del DK190, cultivadas en dos densidades (D).	26
<b>Tabla 3.1.</b> CV de las $TCP_V$ , $TCP_{RT}$ y $TCP_{PC}$ , $TCE_{PC}$ , $PBE_{PC}$ , $BE \cdot BT^{-1}$ , IC, NGP, rinde, peso de grano, ER, TT anthesis, TT <i>silking</i> y ASI de los híbridos DK747 y sus versiones transgénicas, y las versiones transgénicas del DK190, cultivadas en dos densidades.	47
<b>Tabla 4.1.</b> Pares de primers utilizados para la localización del transgén MON810 en los híbridos del grupo DK747 y DK190.	85
<b>Tabla 4.2.</b> Pares de primers utilizados para la localización del transgén NK603 en los híbridos del grupo DK747 y DK190.	87
<b>Tabla 6.1.</b> Estadística descriptiva y test de normalidad para la biomasa total, Rinde, $TCP_{PC}$ , $TCE_{PC}$ , NGP, Peso de grano, ER, TT a anthesis y TT a <i>silking</i> para los híbridos DK747, DK747MG, DK747RR, DK747MGRR, DK190MG, DK190RR y DK190MGRR en $D_6$ y $D_{12}$ .	117
<b>Tabla 6.2.</b> Localización de los SNP variables entre las plantas.	122

## Abreviaturas utilizadas

<b>ASI</b>	Intervalo antesis- $R_1$
<b>BE.BT<sup>-1</sup></b>	Partición de biomasa hacia la espiga en madurez fisiológica
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>D<sub>6</sub></b>	Densidad de 6 plantas $m^{-2}$
<b>D<sub>12</sub></b>	Densidad de 12 plantas $m^{-2}$
<b>ER</b>	Eficiencia reproductiva ( $NGP \text{ TCE}_{PC}^{-1}$ )
<b>IC</b>	Índice de cosecha
<b>IP</b>	Índice de partición
<b>MSAT</b>	marcadores Microsatélites
<b>NGP</b>	Número de granos por planta
<b>NGP<sub>EA</sub></b>	Número de granos por planta de la espiga apical
<b>PBE<sub>PC</sub></b>	Partición de biomasa a espiga durante el período crítico
<b>R<sub>1</sub></b>	Emergencia de estigmas (floración femenina)
<b>R<sub>2</sub></b>	15 días post- emergencia de estigmas
<b>R<sub>6</sub></b>	Madurez fisiológica
<b>SNP</b>	Polimorfismos de Nucleótido simple
<b>TCE<sub>PC</sub></b>	Tasa de crecimiento de la espiga durante el periodo crítico
<b>TCP<sub>PC</sub></b>	Tasa de crecimiento de la planta durante el periodo crítico ( $R_1$ - 15 a $R_2$ )
<b>TCP<sub>RT</sub></b>	Tasa de crecimiento de la planta durante el periodo reproductivo temprano ( $V_7$ a $V_{15}$ )
<b>TCP<sub>V</sub></b>	Tasa de crecimiento de la planta durante el periodo vegetativo ( $V_3$ a $V_6$ )
<b>TT</b>	Tiempo Térmico
<b>V<sub>n</sub></b>	N hojas liguladas del cultivo

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**

## **1.1. Introducción general**

### **1.1.1. Generalidades del cultivo de maíz.**

El cultivo de maíz (*Zea mays*, L.) cumple un rol fundamental en la alimentación humana. En base a una población mundial de alrededor de 6.500.000.000 de personas se estableció un consumo energético promedio de 2.800 kcal persona<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (<http://faostat.fao.org>). Aproximadamente la mitad de esa energía es suministrada por alimentos derivados directamente de los cultivos de cereales. Alrededor de 1.000 kcal son provistas en partes iguales por trigo y arroz, y apenas 150 kcal por maíz. Sin embargo, este último aporta además cerca de 580 kcal de energía como alimento a la actividad pecuaria (e.g., avícola, porcina, vacuna) cuyo fin último es proporcionar proteínas y grasas de origen animal a la dieta humana.

Para el año 2010 la producción mundial de maíz alcanzó las 844.405.181 toneladas de grano con un rendimiento promedio de 5,2 t ha<sup>-1</sup>, en un área de 161.908.449 ha (<http://faostat.fao.org>), una superficie 26% inferior a la requerida para la producción de trigo (cultivo con mayor superficie sobre la Tierra para el mismo período y segundo en producción mundial). Debido a su gran capacidad exportadora, la Argentina (ca. 70% de la producción nacional) se constituye en la actualidad como uno de los principales responsables del abastecimiento de granos de maíz en el mundo, consolidándose como el segundo exportador de maíz luego de EUA (<http://www.usda.gov>).

Desde hace dos décadas la producción nacional de maíz muestra un permanente crecimiento con una tasa anual cercana al 4,4% (Fig. 1.1a.). Este crecimiento productivo está íntimamente asociado a las variaciones en los rendimientos promedio del país (Fig 1.1.b.), y en menor medida a los cambios

en el área implantada (Fig. 1.1c) (<http://www.minagri.gob.ar>); lo cual pone en evidencia la fuerte adopción de tecnologías (e.g., de información, insumos, procesos) por parte del sector agrícola (Satorre, 2005).

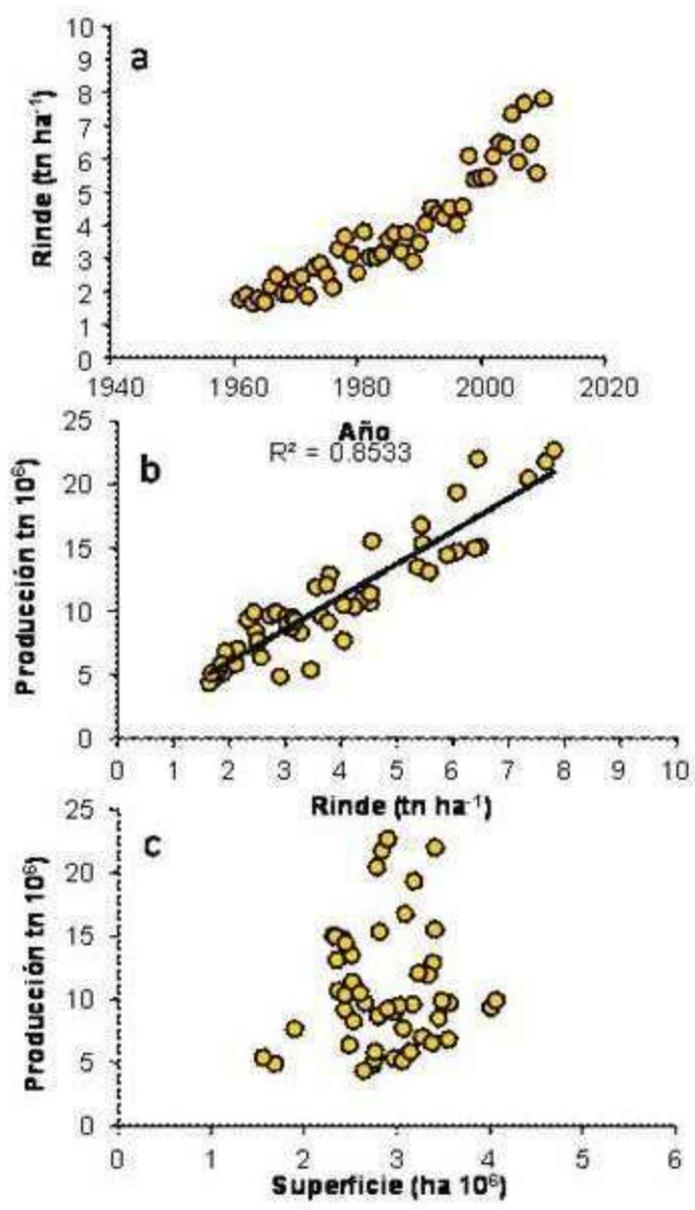


Figura 1.1. Evolución de los rendimientos medios nacionales de maíz (a) y relaciones entre la producción nacional de maíz con la superficie cultivada (b) y los rendimientos medios por hectárea (c). Fuente: <http://faostat.fao.org>

Entre las prácticas agronómicas implementadas en el cultivo de maíz, el mejoramiento genético ha sido el principal factor responsable de los aumentos en los rendimientos por unidad de superficie, tanto a nivel nacional como en el resto del mundo. Así, a partir de la liberación de los primeros híbridos de maíz (híbridos dobles), la contribución de la ganancia genética de 22 materiales argentinos (inscritos entre 1949 y 1984) en el aumento de los rendimientos para igual período, fue de 79% (Mella et al., 1984 a,b) mientras que las estimaciones realizadas para híbridos americanos (período 1930-1990) resultó cercana al 60% (Tollenaar y Lee, 2002).

Los primeros cultivos de maíz en Argentina a principios del siglo XIX se realizaban con semillas de variedades locales o criollas traídas por agricultores inmigrantes del Norte de Italia (Rossi, 2007). Estos materiales se habrían cruzado con materiales americanos existentes cuyo origen geográfico, sería el sur de Brasil, Paraguay y noreste argentino. Los trabajos de mejoramiento de maíz por endocria e hibridación se iniciaron en la década del 20 por iniciativa oficial, a partir del citado germoplasma. Recién en 1945 se lograron los primeros híbridos dobles, los que fueron inscritos en 1949 y fueron sustituyendo gradualmente a las variedades durante un período de 30 años. En la década del 90 se consolidó el predominio de los híbridos simples y, a partir de 1998, se incorporan los cultivares portadores de eventos de transformación genética (transgénicos). El desarrollo de híbridos transgénicos que expresan la endotoxina insecticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt), tienen como principal objetivo el control del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*). Actualmente se dispone de 3 eventos Bt en estado comercial, Mon810 (Yield Gard, MG), BT11 (TDMAX) y TC1507 (HX). MON810 y BT11 controlan eficazmente al

barrenador durante todo el ciclo del cultivo y parcialmente al gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y la isoca de la espiga (*Heliothis zea*). El evento TC1507 permite, además del control de *D. saccharalis* y *H. zea*, un excelente control de *S. frugiperda*, principal plaga en zonas tropicales y subtropicales, y también controla parcialmente la oruga grasienta (*Agrotis ipsilon*). Actualmente existen también híbridos transgénicos tolerantes a glufosinato de amonio (LL o Liberty Link) y a glifosato (eventos NK603 y GA21). También existen híbridos que combinan la tolerancia a herbicidas con resistencia a insectos (variedades stacked o apiladas). Estas tecnologías que facilitan el control de los componentes bióticos del sistema han permitido incrementar los rendimientos medios del cultivo de maíz durante la última década, expandir las áreas de producción de maíz por fuera de las tradicionales zonas de producción nacional y diversificar las fechas de siembra.

Los cultivos de maíz en las zonas templadas de Argentina son en su gran mayoría conducidos en secano, con lo cual la principal restricción climática al rendimiento es el suministro de agua alrededor de la floración femenina que afecta la fijación de granos (Fig. 1.2.).

Es por ello que con las siembras de primavera, la floración del maíz se anticipa a la sequía estacional del verano. Otra posibilidad para escapar a la sequía, es demorar la siembra del maíz hacia finales de la primavera (Maddonni, 2012). Sin embargo, los híbridos convencionales de maíz, son muy afectados en fechas de siembra tardías por el ataque del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) y del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) (Wiatrak et al., 2004). Desde la aparición de los híbridos transgénicos resistentes a lepidópteros, i.e. maíces capaces de expresar la proteína insecticida Cry1Ab

producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (maíz Bt; Williams et al., 1997), la siembra del maíz en fechas tardías se ha extendido con un muy buen beneficio.

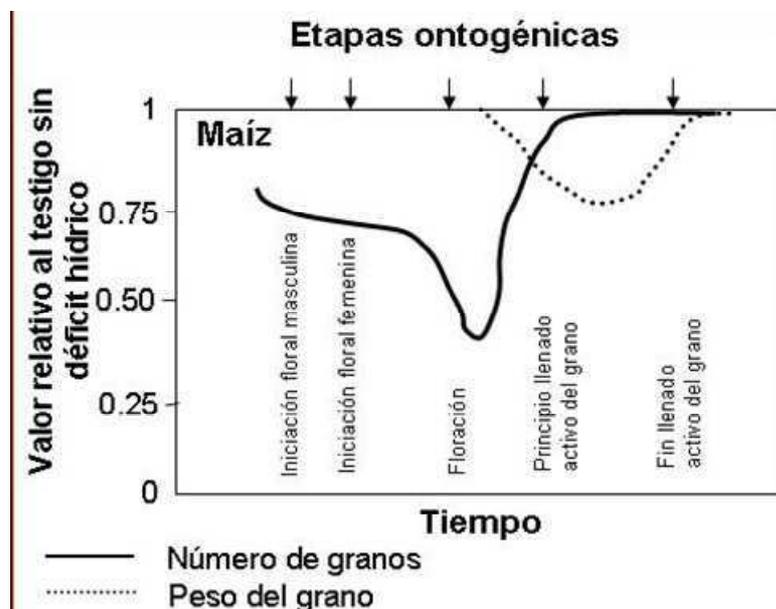


Figura 1.2. Impacto de períodos de déficit hídrico en distintas etapas ontogénicas del cultivo de maíz sobre el número de granos (línea llena) y el peso de los granos (líneas punteadas). Fuente: Hall, 1984.

Otra práctica agronómica con gran difusión en los actuales sistemas de producción de cultivos en Argentina, es la labranza cero, lo que ha llevado a un replanteo de los sistemas de control de malezas. En este contexto, la siembra de híbridos de maíz transgénicos resistentes al herbicida glifosato, ha simplificado las tareas de control y/o reducido los costos involucrados en ella (Norsworthy y Frederick, 2005). Es por ello que en el mercado actual argentino, coexisten híbridos de maíz convencionales y sus versiones transgénicas con

incorporación simple o apilada (tolerancia a diversos lepidópteros + tolerancia al glifosato) de distintos eventos para la protección de los cultivos.

### **1.1.2. Bases eco-fisiológicas de la determinación del rendimiento en maíz**

El rendimiento en el cultivo de maíz se encuentra principalmente determinado por el número de granos por unidad de área (Otegui, 1995). En maíz existe un período crítico (Fig. 1.2) para la determinación del rendimiento que abarca desde los 15 días previos a la emisión de estigmas de las flores femeninas (*silking* o  $R_1$ ; Ritchie y Hanway, 1982) ubicadas en las espigas axilares hasta los 15 días posteriores a  $R_1$ . Durante este período, un estrés lumínico (i.e. disminución de la radiación incidente; Kiniry y Ritchie, 1985) hídrico (Hall et.al., 1981) o nutricional (Uhart y Andrade, 1995) que reduzcan el crecimiento del cultivo provocarán una menor fijación de granos. En el caso particular de este cultivo, la relación entre la tasa de crecimiento y el número de granos es curvilínea cuando se consideran las plantas individuales creciendo sin restricciones hídrico nutricionales (Vega et al., 2001b), lo que destaca dos aspectos distintivos de esta especie: (i) un umbral mínimo de tasa de crecimiento de la planta durante el período crítico ( $TCP_{PC}$ ), por debajo del cual un individuo resulta estéril, y (ii) un valor crítico de  $TCP_{PC}$ , por encima del cual el número de granos por planta (NGP) aumenta (genotipos prolíficos: con capacidad variable de fijar granos en espigas subapicales) o se mantiene estable (genotipos no prolíficos: sin capacidad de fijar granos en espigas subapicales). El umbral para la fijación de granos y la no linealidad en la relación anteriormente planteada sugieren que otros factores distintos a la  $TCP_{PC}$  influyen el NGP, incluyendo la partición de biomasa a las estructuras

reproductivas y un mínimo requerimiento de asimilados para sostener la actividad meristemática (Charles-Edwards, 1984). Al ser esta especie diclinomonóica, es decir que presenta flores masculinas en la panoja apical y flores femeninas en las espigas axilares, una restricción al crecimiento de la planta, exagera la dominancia apical ejercida por la panoja reduciendo la partición de asimilados hacia la espiga (destino secundario), y por lo tanto pudiendo determinar la esterilidad de la planta (Edmeades y Daynard, 1979a; Uhart y Andrade, 1995). Es así que ante situaciones de estrés abiótico, el cultivo de maíz manifiesta una acentuada asincronía entre la liberación de polen y la receptividad de los estigmas y una des-sincronización en la emergencia de estigmas de una misma espiga (Borrás et al., 2007), resultando este último factor el mayor responsable de la pérdida en la fijación de granos a través del aborto de las flores fecundadas tardíamente (Cárcova y Otegui, 2001 y 2007).

### **1.1.3. Variabilidad poblacional en el cultivo de maíz.**

Los actuales sistemas de conducción del cultivo de maíz en ambientes templado-húmedos de la región pampeana, se basan fuertemente en el empleo de altas densidades de siembra ( $\geq 90000$  pl ha<sup>-1</sup>). Este aumento en la presión de competencia intra-específica incrementa la variabilidad natural en el crecimiento de las plantas (Maddonni y Otegui, 2006). Así, un aumento de la densidad poblacional se refleja en una reducción de la biomasa individual de las plantas y en un incremento en la variabilidad del crecimiento de las mismas (Edmeades y Daynard, 1979b; Loomis y Connor, 1992). Se ha demostrado que un incremento de la densidad de siembra desencadena desde etapas tempranas la competencia entre individuos de la misma especie (i.e

competencia intra-específica) (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007). El origen del establecimiento temprano de las plantas con distinta habilidad competitiva aún no está completamente esclarecido. Durante los primeros estadios (i.e. previo al estado de 3 hojas expandidas,  $V_3$ ), las plantas de maíz resultan heterótrofas, es decir su crecimiento lo realizan a expensas de las reservas de las semillas (Cooper y Mac Donald, 1970). Es por ello que, en ausencia de otros factores limitantes (e.g. agua), la uniformidad en la emergencia de las plántulas guarda relación con la uniformidad del calibre de las semillas que las originan y condiciona el crecimiento temprano de las plantas en la fase autotrófica (Pommel et. al., 2001). Por otro lado, el grado de des-uniformidad en la emergencia de las plántulas puede ser producto de la respuesta de la germinación de un material a las bajas temperaturas (Padilla y Otegui 2005). Esta des-uniformidad, sumada a la variabilidad en el espaciamiento entre plantas provocada por aquellas que no emergen, da origen a diferencias en el tamaño entre individuos, que se acentúan con el tiempo y perduran hasta la madurez (Pommel y Bonhomme, 1998). En cultivos con emergencia uniforme de plántulas, también existe variabilidad, no originada por los factores previamente mencionados, que repercute en el éxito reproductivo de los individuos (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007). Sin embargo las bases de las diferencias tempranas entre individuos teóricamente idénticos de la población no resultan claras.

Existe en estas respuestas variabilidad genética, presentando los híbridos más intolerantes a la alta densidad (i) una mayor variabilidad en el crecimiento de las plantas, (ii) una menor partición de biomasa a la espiga durante el período crítico y (iii) una mayor respuesta del número de granos a la tasa de

crecimiento de la espiga (Pagano y Maddonni, 2007), es decir una mayor caída en la fijación de granos ante reducciones en el crecimiento de las plantas (plantas dominadas). Estudios previos han demostrado que el efecto de la jerarquización de plantas sobre la fijación de granos se encuentra mediado por el efecto de la disponibilidad de asimilados sobre la sincronía (i) entre la antesis y *silking* de cada planta y (ii) de la emergencia entre estigmas de la misma espiga (Pagano et al., 2007). Estas observaciones, sin embargo, sólo describen los efectos de la presión de competencia sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo de los individuos y nos permiten comprender los mecanismos responsables de la alta variabilidad entre plantas en el número de granos, pero no informan sobre los mecanismos que originan dichas respuestas. Sin embargo, resulta de interés estudiar los mecanismos subyacentes al origen de la variabilidad poblacional en el crecimiento de las plantas ya que un aumento en el coeficiente de variación del rendimiento de un *stand* de plantas disminuye el rendimiento por unidad de área (Fig. 1.3.).

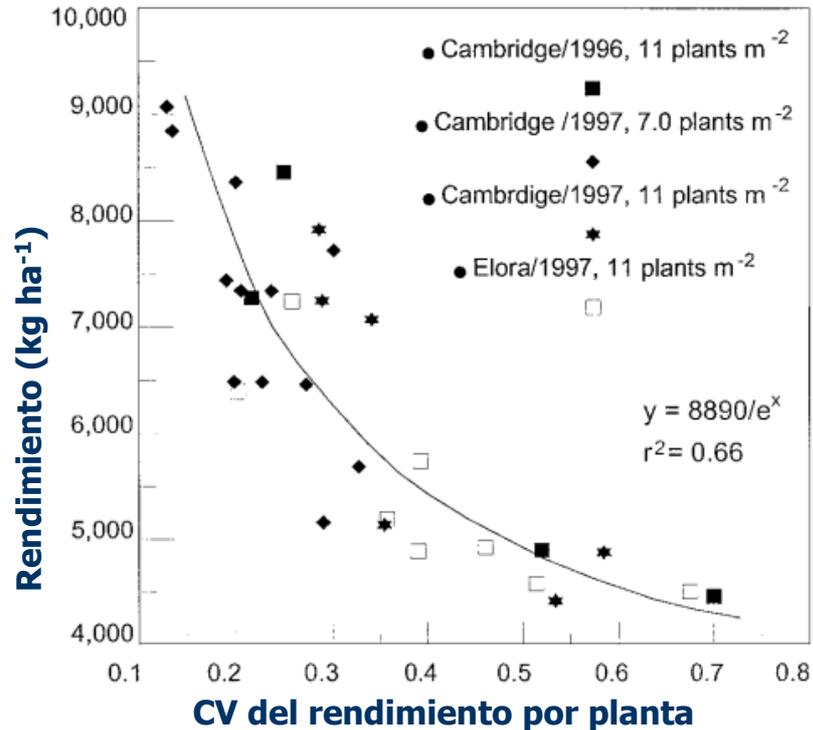


Figura 1.3. Rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>) de maíz en función del coeficiente de variación (CV) del rendimiento por planta. Fuente: Tollenaar y Wu (1999).

#### 1.1.4. Variabilidad genética

Como se mencionó anteriormente existen diferencias genóticas (i.e. entre híbridos de maíz) en el grado de la variabilidad poblacional de diversos rasgos del cultivo de maíz en respuesta al ambiente. Sin embargo el origen genético de la variabilidad poblacional entre las plantas del *stand* de un híbrido simple no ha sido documentado. Estas diferencias genéticas en un híbrido simple, podrían relacionarse con el grado de heterocigosis residual de las líneas puras que lo originan, por contaminación génica durante la multiplicación de la línea, por mutaciones naturales, o combinación de éstas causas (Fleming et al., 1964). La existencia de variación genética dentro de líneas endocriadas de maíz ha sido cuantificada tanto a través de la variabilidad en distintos

caracteres fenotípicos (Higgs y Russell, 1968) como mediante el uso de marcadores moleculares (Liu et. al., 2003). Los autores mencionados concluyen que la detección de una pequeña pero significativa variación genética (4-5%) indicaría que no puede asumirse una homocigosis completa a través de todos los loci.

Por otro lado, en híbridos transgénicos, la incorporación de los eventos se realiza mediante la cruce de una línea fuente del transgén y sucesivas retrocruzas con la línea original. En las retrocruzas, el arrastre por ligamiento de los alelos del padre donante, hace que éstos permanezcan en el genotipo recurrente incrementando la probabilidad de tener loci heterocigotas en la línea modificada (Tanksley y Nelson, 1996). Por lo tanto, el modo de obtención de un híbrido transgénico podría aportar variabilidad genética a los diversos caracteres fenotípicos en condiciones de cultivo. De esta manera, podrían existir diferencias en diversos rasgos y/o en la variabilidad poblacional de ciertos rasgos, entre un híbrido transgénico y un híbrido convencional. La diferente variabilidad poblacional podría verse incrementada en ambientes con menor oferta de recursos.

## **1.2. Objetivos e Hipótesis**

### **1.2.1. Objetivo general**

Comparar diversos rasgos del crecimiento y del desarrollo y su variabilidad poblacional entre versiones convencionales y transgénicas de un mismo híbrido, en ambientes contrastantes en la oferta de radiación, en ausencia de adversidades bióticas y sin restricciones hídrico- nutricionales.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

**1.2.2.1.** Determinar la existencia de variaciones fenotípicas en aspectos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas de maíz en los genotipos en estudio.

**1.2.2.2.** Analizar la distribución poblacional de los diversos rasgos mencionados en 1.2.2.1.

**1.2.2.3.** Determinar la existencia de variabilidad genética entre las versiones de un mismo híbrido y entre plantas de un mismo *stand*.

**1.2.2.4.** Asociar el grado de variabilidad fenotípica con el grado de variabilidad genética.

### **1.2.3. Hipótesis**

**1.2.3.1.** Existen variaciones en diversos rasgos del crecimiento y el desarrollo de las plantas de maíz, entre versiones convencionales y transgénicas y entre distintas versiones transgénicas de un mismo híbrido.

**1.2.3.2.** Las versiones transgénicas presentan mayor variabilidad fenotípica y genotípica que las versiones convencionales. Las versiones con eventos apilados presentarán la mayor variabilidad fenotípica y genotípica de todas las versiones de un mismo híbrido.

**1.2.3.3.** Existe asociación entre las variaciones fenotípicas y las variaciones genotípicas entre las plantas de un mismo genotipo.

## **CAPÍTULO 2**

# **Variaciones fenotípicas entre híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.)**

## 2.1. Introducción

El rendimiento en los cultivos de maíz se encuentra principalmente determinado por el número de granos por unidad de área a madurez fisiológica (Otegui, 1995). Este carácter se relaciona en forma curvilínea con las tasa de crecimiento del cultivo alrededor del período crítico centrado en la floración femenina (Andrade et al., 1999; Maddonni et al., 2006). Para comprender los efectos de la densidad de siembra sobre el rendimiento del cultivo, es necesario desglosar el componente número de granos por unidad de área en sus dos subcomponentes: el número de plantas por unidad de área y el número de granos por planta. Estos dos subcomponentes se hayan relacionados, a través de la tasa de crecimiento de las plantas alrededor del período crítico ( $TCP_{PC}$ ), y para una determinada oferta de recursos, los incrementos en la cantidad de plantas disminuyen la  $TCP_{PC}$  y con ello el número de granos fijados. La naturaleza de la caída en la fijación de granos a bajas  $TCP_{PC}$  revela cambios en la partición de la biomasa hacia la espiga, es por ello que diversos autores (Vega et al., 2001a; Echarte et al., 2004; Echarte y Tollenaar, 2006; Pagano y Maddonni; 2007; D'Andrea et al., 2008; Rossini et al., 20011) han relacionado al número de granos por planta con la tasa de crecimiento de la espiga ( $TCE_{PC}$ ), un estimador más preciso del flujo de asimilados hacia los potenciales destinos reproductivos). A partir de esta relación funcional, se puede cuantificar la eficiencia reproductiva (ER), es decir la cantidad de granos por unidad de  $TCE_{PC}$ . En maíz la ER aumenta a medida que la  $TCE_{PC}$  disminuye, hasta cierto valor umbral, por debajo del cual se vuelve inestable y decae (Vega et al., 2001a), determinando pantas estériles, sin fijación de granos.

Todos estos rasgos han sido analizados para identificar diferencias genotípicas entre híbridos de maíz en la fijación de granos (Echarte et al., 2004; Echarte y Tollenaar, 2006; Pagano y Maddonni; 2007; Rossini et al., 2011). Hasta la fecha ningún trabajo ha explorado estas relaciones para las distintas versiones transgénicas de un híbrido, ni entre las versiones transgénica y la versión convencional. Sin embargo, existe información sobre la mayor producción de biomasa, rendimiento y en la acumulación de nitrógeno en los granos de la versión Bt de un híbrido que su contraparte no transgénica, aún en ausencia de daños por el barrenador del tallo (Ma y Subedi, 2005; Subedi y Ma, 2007). Similarmente, en arroz las variedades transgénicas presentaron un mayor crecimiento que su contraparte convencional, asociado a cambios en la concentración de hormonas como las giberelinas y las auxinas (Wang et al. 2012). Estos resultados sugieren que la introducción de transgenes afectaría la fisiología de las plantas.

El objetivo de este capítulo fue determinar la existencia de variaciones fenotípicas en rasgos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas de maíz entre versiones convencionales y transgénicas de un mismo híbrido y entre las versiones transgénicas. La hipótesis que se puso a prueba es que existen variaciones en caracteres que determinan el crecimiento y el desarrollo de las plantas de maíz, entre versiones convencionales y transgénicas y entre distintas versiones transgénicas de un mismo híbrido.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Diseño experimental**

Se sembraron dos experimentos en forma manual el 30 de octubre de 2008 (Exp 1) y el 30 de octubre de 2009 (Exp 2), en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la UBA (34° 35' S; 58° 29'O) en un suelo franco arcillo limoso. En ambas campañas el cultivo antecesor fue maíz. La capa más externa del suelo (0-20 cm) presentó un contenido de materia orgánica de 27 g kg<sup>-1</sup>, P mineral de 17,3 mg kg<sup>-1</sup>, y N orgánico de 1,5 g kg<sup>-1</sup>. En estos experimentos se utilizó un diseño de parcelas divididas en bloques al azar siendo la parcela principal la densidad de siembra (D<sub>6</sub>: 6 pl m<sup>-2</sup> y D<sub>12</sub>: 12 pl m<sup>-2</sup>) y la sub-parcela (de ahora en más denominada parcela) el híbrido. Cada parcela constó de tres hileras de cultivo de 5 m de largo, distanciadas a 0,5 m. En cada combinación de bloque y densidad se sembraron los híbridos simples DK747 en su versión convencional y sus versiones transgénicas Bt (MG), RR y BtRR (MGRR); y el híbrido simple DK190<sup>1</sup> en sus versiones transgénicas Bt (MG), RR y BtRR (MGRR).

El 28 de octubre de 2010 se sembró un tercer experimento (Exp 3), con el objetivo de estudiar los diversos rasgos en plantas con muy bajas tasas de crecimiento alrededor del período crítico. En este experimento se utilizaron los mismos híbridos sembrándolos en parcelas de 15 m de largo por 2 m de ancho, en una única repetición. Cada parcela constó de 4 hileras espaciadas a 0,5 m. En cada hilera se varió la distancia entre plantas: a 5 cm en la primera hilera, a 10 cm en la segunda, a 20 cm en la tercera y a 40 cm en la cuarta hilera.

---

<sup>1</sup> La empresa no produce más el híbrido DK190 en su versión convencional

Todos los experimentos fueron conducidos con riego complementario (riego por goteo) sin limitaciones nutricionales (aplicación manual de  $150 \text{ kg N ha}^{-1}$  en forma de urea e incorporado inmediatamente con una asada en el estado de 6 hojas liguladas,  $V_6$ ; Ritchie et al., 1993), con controles de malezas mecánicos y químicos (atrazina  $4 \text{ l ha}^{-1}$ ) y controles químicos de plagas (clorpirifos  $1 \text{ l ha}^{-1}$ ; cipermetrina  $245 \text{ ml ha}^{-1}$ ).

### **2.2.2. Registro de eventos fenológicos y estimación de la biomasa de las plantas**

En los Exps 1 y 2 se identificaron tempranamente ( $V_3$ ) 10 plantas consecutivas de igual estado ontogénico y similar tamaño en la hilera central de cada parcela. Sobre estas plantas marcadas se registraron semanalmente los estados vegetativos ( $V_n$ ) y diariamente la floración masculina (i.e. anthesis, al menos una antera liberando polen) y femenina (al menos un estigma visible por fuera de las chalas; estado  $R_1$ ) para también registrar el intervalo entre la anthesis y el  $R_1$  de cada planta (ASI). En el Exp 3 también se identificaron en  $V_3$  entre 45 y 50 plantas de cada híbrido. Las mismas se encontraban ubicadas en una superficie de  $2 \text{ m}^2$ , abarcando 1 metro lineal de cada una de las 4 hileras de la parcela. En estas plantas se registraron los mismos eventos fenológicos anteriormente descritos para los Exps 1 y 2.

Para caracterizar el crecimiento individual de las plantas marcadas a lo largo del ciclo, se utilizó un método no destructivo basado en modelos alométricos que estiman las biomásas de las plantas a partir de variables morfométricas (Vega et al., 2001b; Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007; Rossini et al., 2011). Para la construcción de estos modelos, en los Exps 1 y 2

se realizaron muestreos semanales de 10-20 plantas por híbrido desde  $V_3$  hasta  $R_1$  (cuando el 50% de las plantas de cada parcela presentaba estigmas visibles) y a los 15 días del muestreo de  $R_1$  (i.e.  $R_2$ ). En el Exp 3 se muestrearon 11 plantas por híbrido (ca. 5 plantas de la primera hilera, 3 plantas de la segunda, 2 plantas de la tercera, y 1 planta de la cuarta) en prefloración (una semana antes de  $R_1$ ), y 30- 40 plantas por híbrido (ca. 20 plantas de la primera hilera, 10 plantas de la segunda, 5 plantas de la tercera, y 2-3 plantas de la cuarta) en los estados de  $R_1$  y  $R_2$  de cada planta, i.e. estos últimos muestreos no fueron realizados a fecha fija sino respetando la fenología de cada planta. Para ello se identificaron en pre-floración dos zonas de muestreo por híbrido. En una zona se cosecharon las plantas a medida que llegaban a  $R_1$ , y paralelamente se registró la fecha de *silking* de cada planta de la segunda zona, para luego muestrearlas a los 15 días de sus fechas de  $R_1$ . A todas las plantas muestreadas se les realizaron dos mediciones del diámetro de la base del tallo (valor máximo y mínimo), y una medición del largo del tallo desde la base hasta la lígula de la última hoja totalmente expandida. En los estados  $R_1$  y  $R_2$  se midió además el diámetro máximo de la espiga apical. Las plantas luego fueron individualmente embolsadas y secadas en estufa (60°C) de circulación forzada hasta constancia de peso, para la posterior obtención del valor de materia seca total (todos los muestreos) y materia seca de las espiga (en  $R_1$  y  $R_2$ ).

Con los datos de biomasa y las mediciones alométricas se construyeron modelos lineales y bi-lineales que estimaron la biomasa aérea total desde  $V_3$  hasta  $R_1$  y la biomasa vegetativa (tallos + hojas + panoja) en  $R_2$ , a partir del volumen de un cilindro según el diámetro promedio de la base del tallo y el

Tabla 2.1. Parámetros de los modelos alométricos utilizados para estimar: (i) biomasa total de las plantas (g) durante el período previo a *silking* ( $V_3$ -  $R_1$  para los  $Exp_1$  y  $Exp_2$ ,  $V_{16}$ -  $R_1$  para el  $Exp_3$ ), (ii) biomasa vegetativa de las plantas (g) luego de 15 días desde *silking* ( $R_2$ ), y (iii) biomasa de las espigas (g) en *silking* ( $R_1$ ) y 15 días luego de *silking* ( $R_2$ ). El coeficiente de determinación y el número de datos utilizado para los ajustes de los modelos se indican como  $r^2$  y  $n$  respectivamente.

Biomasa total de planta durante el período previo a <i>silking</i>										
Genotipo	Exp <sub>1</sub>		Exp <sub>2</sub>		Exp <sub>3</sub>					
	<i>a</i>	$r^2, n$	<i>a</i>	$r^2, n$	<i>a</i>	$r^2, n$	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	$r^2, n$
DK747	0.156	0.93, 76	0.115	0.91, 73	0.1291	0.93, 43				
DK747MG	0.18	0.96, 76	0.119	0.93, 75	0.1253	0.86, 39				
DK747RR	0.144	0.94, 75	0.113	0.91, 74	0.1293	0.85, 47				
DK747MGRR	0.151	0.95, 73	0.143	0.94, 74	0.131	0.91, 40				
DK190MG	0.145	0.89, 75	0.159	0.95, 73			0.172	524.14	0.049	0.90, 44
DK190RR	0.174	0.89, 75	0.151	0.96, 73	0.129	0.80, 39				
DK190MGRR	0.164	0.92, 74	0.157	0.94, 73	0.134	0.81, 40				

Biomasa vegetative en $R_2$									
Grupo	Exp <sub>1</sub>			Exp <sub>2</sub>			Exp <sub>3</sub>		
	<i>e</i>	<i>f</i>	$r^2, n$	<i>e</i>	<i>f</i>	$r^2, n$	<i>e</i>	<i>F</i>	$r^2, n$
Group DK747	0.0831	71.024	0.71, 37	0.1094	43.95	0.72, 40	0.1026	17.646	0.9, 123
Group DK190	0.1243	37.045	0.79, 30	0.1049	47.12	0.77, 30	0.1074	19.691	0.9, 85

Biomasa de espiga en $R_1$ y $R_2$									
Genotipo	Exp <sub>1</sub> y Exp <sub>2</sub>			Exp <sub>3</sub>					
	<i>g</i>	<i>h</i>	$r^2, n$	<i>g</i>	<i>h</i>	$r^2, n$			
DK747	0.0022	25.663	0.94, 37	0.0003	30.086	0.95, 67			
DK747MG	0.001	27.559	0.97, 38	0.0003	29.773	0.97, 59			
DK747RR	0.0008	28.556	0.96, 37	0.0005	28.542	0.94, 65			
DK747MGRR	0.0006	29.495	0.96, 37	0.0003	30.516	0.97, 58			
DK190MG	0.0009	27.875	0.95, 37	0.0005	28.738	0.97, 67			
DK190RR	0.0002	31.331	0.97, 35	0.0002	3.148	0.96, 51			
DK190MGRR	0.0004	30.301	0.97, 37	0.0003	29.979	0.97, 56			

largo del tallo ( $\pi$  \* radio promedio de la base del tallo<sup>2</sup> \* largo del tallo). Para todos los híbridos, los modelos de biomasa total para el período V<sub>3</sub>-R<sub>1</sub> (Ec. 1 y Tabla 2.1) y de biomasa vegetativa en R<sub>2</sub> (Ec. 2.4 y Tabla 2.1) resultaron lineales, a excepción del modelo de biomasa total del híbrido DK190MG en el período V<sub>3</sub>-R<sub>1</sub> del Exp 3 cuyo mejor ajuste de los datos ( $>r^2$ ) se obtuvo con un modelo bi- lineal (Ecs. 2.2 y 2.3 y Tabla 2.1). En el ajuste de los modelos de biomasa total del período V<sub>3</sub>-R<sub>1</sub> se consideró una ordenada al origen igual a cero, para incrementar la sensibilidad de los mismos ante valores bajos de volumen (i.e. estados fenológicos tempranos). Los modelos utilizados para estimar la biomasa reproductiva fueron construidos a partir de una función exponencial entre la biomasa total de la espiga (espiga más chalas) y el diámetro máximo (Ec. 2.5 y Tabla 2.1).

$$\text{Biomasa total V}_3\text{-R}_1 \text{ (g)} = a \text{ vol} \quad \text{Ec. (2.1)}$$

$$\text{Biomasa total V}_3\text{-R}_1 \text{ (g)} = b \text{ vol} \quad \text{para vol} < c \quad \text{Ec. (2.2)}$$

$$\text{Biomasa total V}_3\text{-R}_1 \text{ (g)} = b c + d (\text{vol} - c) \quad \text{para vol} > c \quad \text{Ec. (2.3)}$$

$$\text{Biomasa vegetativa R}_2 \text{ (g)} = f + e \text{ vol} \quad \text{Ec. (2.4)}$$

$$\text{Biomasa reproductiva (g)} = g D^h \quad \text{Ec. (2.5)}$$

donde  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$ ,  $g$  y  $h$  son parámetros de los modelos ajustados, vol es el volumen del cilindro (en cm<sup>3</sup>) y  $D$  es el diámetro máximo de la espiga apical (en mm).

En las plantas marcadas de las parcelas destinadas al seguimiento de la fenología y del crecimiento, se realizaron las mismas mediciones en iguales momentos que en las plantas muestreadas para la obtención de los modelos.

Con las mediciones del diámetro y del largo del tallo se calculó el volumen del cilindro y a partir de las Ecs. 2.1- 2.3 según el genotipo, se estimó la biomasa individual de las plantas en pre-floración. Para la estimación de la biomasa reproductiva en  $R_1$  y  $R_2$  se utilizó la medición del diámetro máximo de la espiga y la Ec. 2.5. Para estimar la biomasa total de las plantas en  $R_2$  se utilizaron las mediciones correspondientes a dicho estado, y el modelo de biomasa vegetativa en  $R_2$  (Ec. 2.4) más el modelo de biomasa reproductiva (Ec. 2.5). Finalmente, en madurez fisiológica se cosecharon individualmente las plantas marcadas y luego de ser secadas en estufa de circulación forzada, se determinó la biomasa total (BT), el rendimiento en grano posteriormente a la trilla de los granos (rinde), y los componentes numéricos del rendimiento: número de granos por planta (NGP) y peso de los granos, este último estimado como el cociente entre el rinde y el NGP.

### **2.2.3. Crecimiento de las plantas, partición de biomasa y fijación de granos**

En los tres experimentos se estimaron las tasas de crecimiento de las plantas marcadas en diferentes momentos del ciclo, a partir de la pendiente de la regresión ajustada a la biomasa por planta en función del tiempo en días desde la siembra (Rossini et al., 2011) para los períodos: vegetativo de  $V_3$  a  $V_6$  ( $TCP_V$ ); reproductivo temprano desde  $V_7$  hasta  $V_{15}$  ( $TCP_{RT}$ ), y período crítico, desde  $R_1-15$  días hasta  $R_2$  ( $TCP_{PC}$ ). Para el cálculo de la  $TCE_{PC}$  se utilizó una biomasa de espiga igual a cero en  $R_1-227^\circ\text{Cd}$  (Otegui y Bonhomme, 1998) utilizando el modelo de tiempo térmico con temperatura base  $8^\circ\text{C}$  (Ritchie y NeSmith, 1991) y las biomásas reproductivas en  $R_1$  y  $R_2$ .

La partición de la biomasa total hacia la espiga se cuantificó a través del cociente entre (i) las  $TCE_{PC}$  y  $TCP_{PC}$  ( $IP_{PC}$ , Pagano y Maddonni, 2007) y (ii) la biomasa total de la espiga (chalas+granos+marlo) y BT en  $R_6$  ( $BE BT^{-1}$ ) También se cuantificó el índice de cosecha de cada planta con el cociente entre el peso de los granos y la BT de las plantas.

El NGP de la espiga apical ( $NGP_{E1}$ ) se relacionó con la  $TCP_{PC}$  y con la  $TCE_{PC}$  (Vega et.al., 2001b), ajustando el mismo modelo no lineal (Ecs. 2.6 y 2.7).

$$NGP_{E1} = [i(TCP_{PC} - j)] / [1 + k(TCP_{PC} - j)], \quad \text{para } TCP_{PC} > j \quad \text{Ec. (2.6)}$$

$$NGP_{E1} = [l(TCE_{PC} - m)] / [1 + n(TCE_{PC} - m)], \quad \text{para } TCE_{PC} > m \quad \text{Ec. (2.7)}$$

donde  $i$  y  $l$  son las pendientes iniciales,  $j$  y  $m$  son los valores umbrales de  $TCP_{PC}$  o de  $TCE_{PC}$  respectivamente para la fijación de granos (i.e.  $NGP_{E1} > 0$ ) y  $k$  y  $n$  representan el grado de curvilinearidad para altos valores de  $TCP_{PC}$  y  $TCE_{PC}$ , respectivamente.

La ER de cada planta fue calculada a partir del cociente entre el  $NGP_{E1}$  y la  $TCE_{PC}$  (Vega et al., 2001a).

#### **2.2.4. Análisis de datos**

En los Exps 1 y 2 los efectos de los tratamientos (densidad e híbrido) y sus interacciones sobre las variables medidas y calculadas a través de los años, fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA).

Las relaciones entre variables de todo el conjunto de datos de cada genotipo fueron testeadas mediante análisis de correlación y regresión

utilizando el programa TBLCURVE (Jandel, 1992). Los ANOVAs y las pruebas de t fueron realizadas con Statistix 7.0 (Statistix, 2000). El ajuste de los modelos fue realizado con el programa TBLCURVE (Jandel, 1992) y las diferencias entre años y genotipos en los parámetros de los modelos ajustados fueron analizadas con los intervalos de confianza al 95%.

Para el conjunto de datos de cada grupo de híbridos, se construyeron líneas de frontera para la relación entre el  $NGP_{E1}$  y la  $TCE_{PC}$  con el método de regresión por cuantiles del programa R (R Development Core Team, 2008), utilizando el cuartil 0,99. La inversa de dicha función sería indicativa de la máxima ER para cada valor de  $TCE_{PC}$  de cada grupo de híbridos. Luego se calculó la diferencia entre el valor real de la ER de cada planta ( $NGP_{TCE_{PC}^{-1}}$ ) y el valor de la línea de frontera y se cuantificó la dispersión de las diferencias de cada genotipo con la raíz cuadrada del cuadro medio del error (RMSE; Ec 2.8; Potter y Williams, 1994).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (ER_{Ai} - ER_{Hi})^2}{N}} \quad (\text{Ec 2.8})$$

donde  $ER_{Ai}$  representa cada uno de los valor observados,  $ER_{Hi}$  representa el valor de la variable según la línea de frontera y  $N$  es el número de observaciones de cada genotipo.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Crecimiento de las plantas

En ambos experimentos, el incremento de la densidad de siembra redujo la  $TCP_{PC}$  ( $0.0001 < P < 0.01$ ; Tabla 2.2). Sólo durante el Exp 2, dicho efecto fue detectado desde etapas más tempranas del cultivo ( $P < 0.05$ ; para la interacción E x D sobre  $TCP_V$ ,  $TCP_{RT}$ ) y sostenido a lo largo del ciclo.

Las diferencias en el crecimiento de las plantas entre las distintas versiones de cada híbrido se detectaron después de  $V_6$ , puesto que las  $TCP_V$  sólo difirieron ( $P < 0.1$ ) entre grupos de híbridos (ca.  $0.50$  y  $0.57$   $g\ d^{-1}$  para el grupo DK747 y DK190, respectivamente). Tanto la  $TCP_{RT}$  como la  $TCP_{PC}$  evidenciaron interacciones H x E x D ( $P < 0.05$ ). Así, en ambos experimentos, las mayores  $TCP_{RT}$  dentro del grupo de híbridos DK747 la presentó el DK747MGRR en  $D_6$  y el DK747MG en  $D_{12}$ . En el grupo del DK190, se observaron diferencias significativas entre genotipos sólo en  $D_6$  ( $P < 0.05$ ). Para esta densidad las mayores  $TCP_{RT}$  las presentaron el DK190RR y DK190MGRR en el Exp 1, y el DK190MG en el Exp 2. Con respecto a la  $TCP_{PC}$ , durante el Exp 1 y dentro de cada grupo de híbridos, las mayores  $TCP_{PC}$  las alcanzaron los híbridos DK747MGRR y DK747RR tanto en  $D_6$  como en  $D_{12}$  y el DK190MG en  $D_6$  y el DK190MGRR en  $D_{12}$ . Por el contrario durante el Exp 2, no se detectaron diferencias en las  $TCP_{PC}$  entre las distintas versiones dentro de cada grupo de híbridos.

Tabla 2.2. Tasas de crecimiento de las plantas durante el período vegetativo ( $TCP_V$ ), el período reproductivo temprano ( $TCP_{RT}$ ) y el período crítico ( $TCP_{PC}$ ), tasas de crecimiento de las espigas durante el período crítico ( $TCE_{PC}$ ), partición de biomasa hacia la espiga durante el período crítico ( $PBE_{PC}$ ), partición de biomasa hacia la espiga en madurez fisiológica ( $BE \cdot BT^{-1}$ ), índice de cosecha ( $IC$ ), número de granos por planta ( $NGP$ ), Rinde, peso de grano, eficiencia reproductiva ( $ER$ ), tiempo térmico hasta antesis ( $TT$  antesis), tiempo térmico hasta *silking* ( $TT$  *silking*) e intervalo antesis- *silking* ( $ASI$ ) de los híbridos (H) DK747 y sus versiones transgénicas, y las versiones transgénicas del DK190, cultivadas en dos densidades (D). Los valores representan la media de los  $Exp_1$  y  $Exp_2$  (E).

Híbrido	Densidad ( $pl\ m^{-2}$ )	$TCP_V$ ( $g\ d^{-1}$ )	$TCP_{RT}$ ( $g\ d^{-1}$ )	$TCP_{PC}$ ( $g\ d^{-1}$ )	$TCE_{PC}$ ( $g\ d^{-1}$ )	$PBE_{PC}$	$BE \cdot BT^{-1}$	$IC$	$NGP$	Rinde ( $g\ pl^{-1}$ )	Peso de grano (mg)	$ER$ ( $k\ d\ g^{-1}$ )	$TT$ antesis ( $^{\circ}Cd$ )	$TT$ <i>silking</i> ( $^{\circ}Cd$ )	$ASI$ (d)
747	6	0.59	4.44	7.32	2.26	0.31	0.65	0.54	693.73	204.88	296.01	297.45	918.76	931.23	0.67
747MG	6	0.63	4.50	6.91	2.05	0.30	0.64	0.53	653.75	199.78	306.03	336.53	933.20	943.57	0.57
747RR	6	0.59	4.21	7.59	2.42	0.32	0.65	0.54	668.71	198.69	297.05	282.95	914.23	925.43	0.64
747MGRR	6	0.68	5.10	7.44	2.56	0.35	0.64	0.53	653.57	202.24	310.71	256.78	923.91	933.18	0.52
190MG	6	0.63	4.79	6.65	2.32	0.36	0.63	0.53	760.1	199.79	260.45	287.73	955.71	965.22	0.57
190RR	6	0.66	5.10	6.13	1.94	0.33	0.65	0.54	782.47	193.39	251.52	261.37	949.79	961.47	0.67
190MGRR	6	0.73	5.10	6.58	2.57	0.40	0.65	0.53	776.57	186.79	244.01	248.99	952.41	957.17	0.32
747	12	0.36	2.36	4.51	1.59	0.35	0.61	0.51	451.08	113.31	252.65	317.83	967.34	1001.80	2.05
747MG	12	0.45	2.85	4.57	1.45	0.32	0.61	0.51	465.35	114.02	245.25	362.28	969.56	1000.60	1.95
747RR	12	0.38	2.42	4.76	1.70	0.36	0.60	0.58	461.40	120.02	228.32	285.50	950.92	975.57	1.43
747MGRR	12	0.36	2.64	4.83	1.90	0.40	0.62	0.52	455.85	117.16	257.03	244.38	968.71	990.80	1.33
190MG	12	0.37	2.84	3.92	1.63	0.41	0.59	0.50	438.97	100.78	232.08	301.81	1001.30	1032.80	2.05
190RR	12	0.43	2.81	3.79	1.48	0.39	0.61	0.52	454.02	108.53	240.13	262.55	988.06	1018.30	1.87
190MGRR	12	0.62	2.77	4.41	1.97	0.46	0.61	0.52	458.05	107.64	235.28	260.86	986.56	1011.40	1.67

Nivel de significancia de los efectos principales e interacciones

E	*						**	*	*	*		**			***
D	**	**	***	***	**	**			***	***	**		**	***	**
E x D	*	*										†			
H	†	***	***	***	***	†		**			***	***	***	***	*
H x E		**	***		*										
H x D								***			***				
H x E x D		*	*										†		*

† nivel de significancia a  $P < 0.1$   
 \* nivel de significancia a  $P < 0.05$   
 \*\* nivel de significancia a  $P < 0.01$   
 \*\*\* nivel de significancia a  $P < 0.001$

### **2.3.2. Dinámica de la floración masculina (antesis) y femenina (*silking*) e intervalo antesis-*silking* (ASI)**

En los Exp 1 y 2, el tiempo térmico (TT) a antesis y *silking* de todos los genotipos se incrementó en respuesta al aumento de la densidad de siembra ( $P<0.001$ ; Tabla 2.2). En general, los híbridos del grupo DK747 presentaron un menor TT a antesis y *silking* que los del grupo DK190, resultando el DK747RR el híbrido más precoz en ambos rasgos en ambas densidades ( $P<0.01$ ; Tabla 2.2). Por el contrario, los híbridos del grupo DK190 no presentaron diferencias en el TT a *silking* y sólo el DK190RR en el Exp 2 en  $D_{12}$  presentó un menor TT a antesis que los restantes híbridos de su grupo.

Parte de las diferencias entre los grupos de híbridos en los TT a antesis y *silking* fueron originadas por el diferente número final de hojas ( $P<0.001$ ). Los híbridos del grupo DK190 presentaron entre 19 y 20 hojas y los del grupo DK747 entre 18 y 19 hojas. Sin embargo este rasgo, no explicó el menor TT a antesis del DK747RR y del DK190RR. La mayor precocidad del híbrido DK747RR también se repitió en el Exp 3. Este genotipo presentó un menor TT a antesis que las demás versiones del grupo ( $0.1<P<0.05$ ) y un menor TT a *silking* que el DK747 ( $P<0.1$ ; Tabla 2.3). Dentro del grupo del DK190, el DK190RR fue el de menor TT a antesis (Tabla 2.3) en  $D_6$ , difiriendo significativamente del DK190MG ( $P<0.001$ ).

Como consecuencia del mayor impacto de la densidad de siembra sobre los TT a  $R_1$  que a la antesis, el ASI en  $D_{12}$  se incrementó ( $P<0.01$ ; Tabla 2.2) en ca. 1 día para los híbridos del grupo DK747 y en ca. 1.7 días para los híbridos del grupo DK190. Dentro del grupo del DK747, el mayor ASI en  $D_{12}$  lo presentó el DK747 (ca. 2 días) y los menores ASIs (ca. 1.3 días) el DK747RR y

DK747MGRR ( $P < 0.05$ ; Tabla 2.2). En esta misma densidad, se evidenció también una tendencia a un menor ASI en el DK190MGRR aunque la diferencia (menor a 1 día) con las demás versiones no resultó significativa. Sólo en  $D_6$  en el Exp 2 el DK190MGRR presentó el menor ASI ( $P < 0.05$ ; para la interacción H x E x D, Tabla 2.2).

Finalmente, las plantas del Exp 3 presentaron mayores ASI (ca. 3.7 y 2.9 días para los híbridos del grupo DK747 y DK190, respectivamente) que las de los Exp 1 y Exp 2.

### **2.3.3. Partición de biomasa y crecimiento de la espiga**

En los Exps 1 y 2 el incremento de la densidad de siembra se tradujo en un leve incremento de la partición de biomasa hacia la espiga durante el período crítico (ca. 0.34 para  $D_6$  y 0.37 para  $D_{12}$ ;  $P < 0.01$ ; Tabla 2.2), pero disminuyó la  $TCE_{PC}$  (ca. 2.3 y 1.6  $g\ d^{-1}$  en  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente). En ambas densidades, los híbridos DK747MGRR (Exp 1) y DK190MGRR (Exps 1 y 2) presentaron los mayores valores de partición de biomasa hacia la espiga ( $P < 0.05$  para H x E; Tabla 2.2) y tanto el DK747RR como el DK747MGRR dentro del grupo DK747 y el DK190MGRR en el grupo DK190 presentaron las mayores  $TCE_{PC}$  ( $P < 0.001$ , Tabla 2.2). En el Exp 3 las plantas del DK747MGRR alcanzaron también mayores valores de  $TCE_{PC}$  que las versiones MG y RR, pero evidenciaron una fuerte caída en la partición en las plantas con  $TCE_{PC}$  menores a 4  $g\ d^{-1}$  (Fig. 2.1a.). Contrariamente los híbridos del grupo DK190 presentaron similares  $TCE_{PC}$  durante el Exp 3.

En  $R_6$  la proporción de la biomasa total alocada en la espiga ( $BE\ BT^{-1}$ ; Tabla 2.2), difirió entre experimentos (ca. 0.65 y 0.61 en los Exp 1 y Exp 2

Figura 2.1: Relaciones entre (i) número de granos de la espiga apical ( $NGP_{EA}$ ) y tasa de crecimiento de la planta durante el período crítico ( $TCP_{PC}$ ) (a, d), (ii) tasa de crecimiento de la espiga durante el período crítico ( $TCE_{PC}$ ) y  $TCP_{PC}$  (b, e) y (iii)  $NGP_{EA}$  y  $TCE_{PC}$  (c, f) del DK747 y sus versiones transgénicas (a, b y c) y de las versiones transgénicas del DK190 (d, e y f). Símbolos: cuadrados ( $6 \text{ pl m}^{-2}$ ); triángulos ( $12 \text{ pl m}^{-2}$ ); símbolos llenos (Exp 1); símbolos vacíos (Exp 2) y círculos grises (Exp 3). Las líneas en (b) y (e) representan los cocientes 0.50 (continua) y 0.25 (punteada) entre  $TCE_{PC}$  y  $TCP_{PC}$  (i.e. partición de biomasa hacia la espiga). Figuras insertas (c, f) muestran las relaciones entre la eficiencia reproductiva (ER) y las  $TCE_{PC}$  y las líneas punteadas representan los valores máximos de ER (línea de frontera). Para el DK747 en (a):  $i= 224.6$ ,  $j= 0.532$ ,  $k=0.207$  ( $r^2=0.75$ ,  $n= 160$ ); en (c):  $l= 635.4$ ,  $m= 0.059$ ,  $n= 0.565$  ( $r^2=0.78$ ,  $n= 160$ ). Para el DK747MG en (a):  $i= 276.8$ ,  $j= 0.538$ ,  $k= 0.298$  ( $r^2= 0.69$ ,  $n= 166$ ); en (c):  $l= 760.1$ ,  $m= 0.044$ ,  $n= 0.713$  ( $r^2= 0.81$ ,  $n= 166$ ). Para el DK747RR en (a):  $i= 223.1$ ,  $j= 0.2189$ ,  $k= 0.222$  ( $r^2= 0.71$ ,  $n= 164$ ); en (c):  $l= 647.4$ ,  $m= 0.029$ ,  $n= 0.618$  ( $r^2=0.79$ ,  $n= 164$ ). Para el DK747MGRR en (a):  $i= 336.3$ ,  $j= 1.923$ ,  $k= 0.362$  ( $r^2= 0.69$ ,  $n= 168$ ); en (c):  $l= 410.5$ ,  $m= 0.049$ ,  $n= 0.259$  ( $r^2= 0.82$ ,  $n= 168$ ). Para el DK190MG en (d):  $i= 290.4$ ,  $j= 0.113$ ,  $k= 0.344$  ( $r^2= 0.66$ ,  $n= 165$ ); en (f):  $l= 643.8$ ,  $m= 0.066$ ,  $n= 0.618$  ( $r^2= 0.75$ ,  $n= 165$ ). Para el DK190RR en (d):  $i= 491.2$ ,  $j= 1.358$ ,  $k= 0.648$  ( $r^2= 0.71$ ,  $n= 165$ ); en (f):  $l= 509.9$ ,  $m= 0.044$ ,  $n= 0.449$  ( $r^2= 0.78$ ,  $n= 165$ ). Para el DK190MGRR en (d):  $i= 288.6$ ,  $j= 0.170$ ,  $k= 0.362$  ( $r^2= 0.65$ ,  $n= 171$ ); en (f):  $l= 793.5$ ,  $m= 0.042$ ,  $n= 0.996$  ( $r^2= 0.70$ ,  $n= 170$ ).

Fig.2.1.

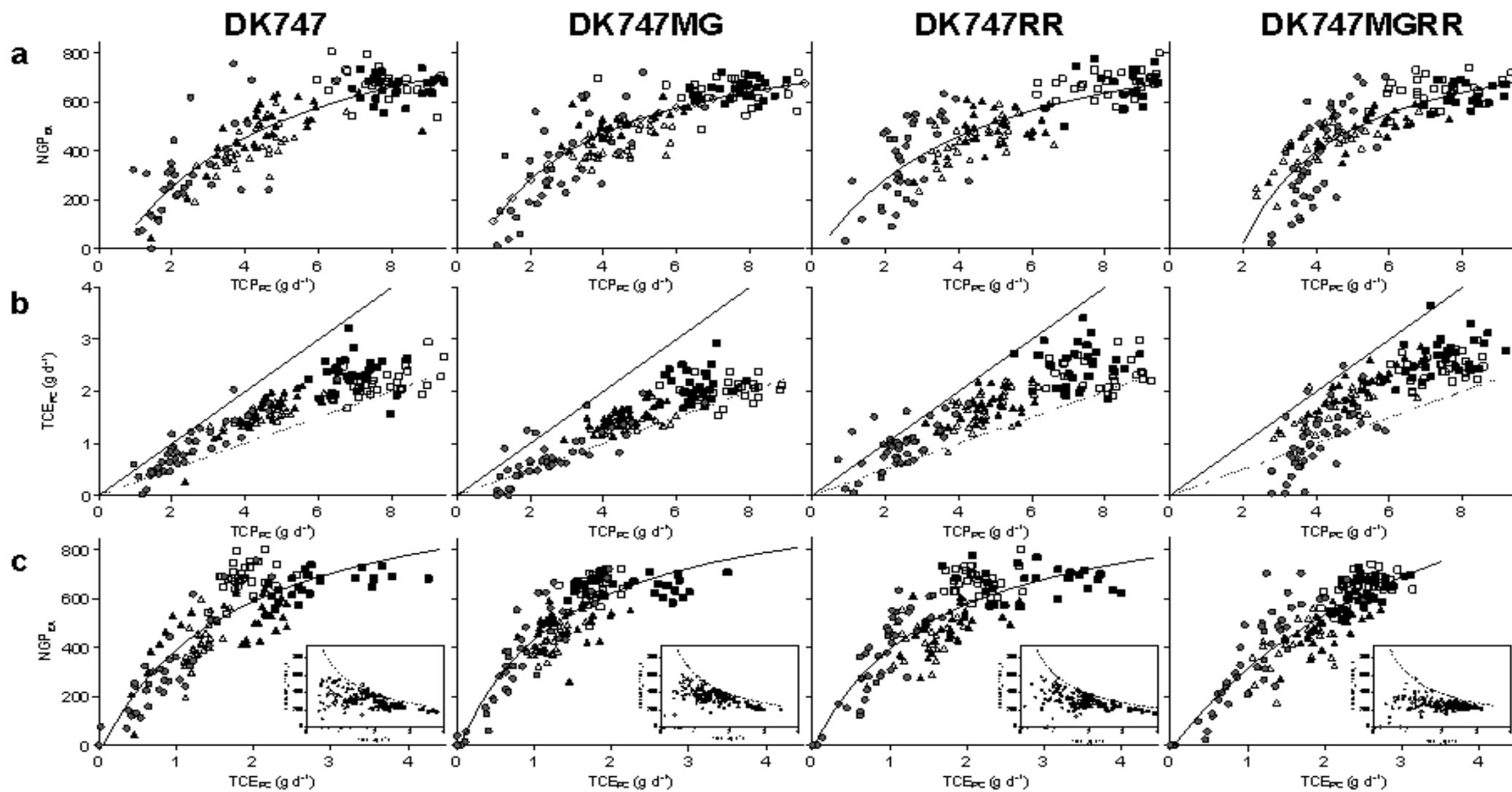
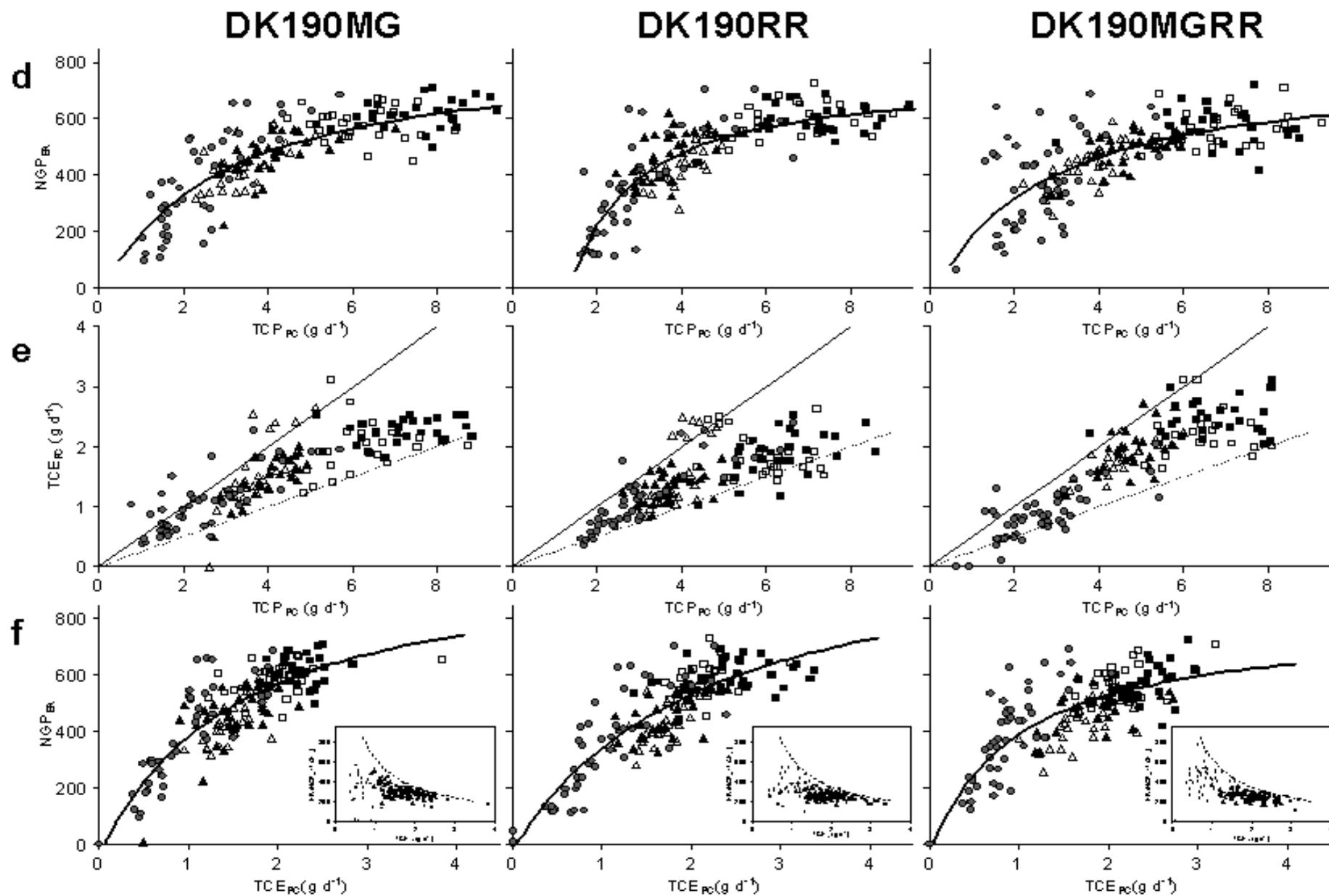


Fig.2.1. (continuación)



respectivamente;  $P < 0.01$ ) y densidades (ca. 0.64 y 0.60 en  $D_6$  y  $D_{12}$  respectivamente;  $P < 0.01$ ). El DK190MG presentó una partición ligeramente menor ( $P < 0.1$ ) a la de los restantes híbridos del grupo en  $D_6$  y  $D_{12}$  (Tabla 2.2).

La partición de la biomasa total hacia los granos (i.e. índice de cosecha, IC) también resultó diferente entre experimentos (ca. 0.54 y 0.51 para el Exp 1 y Exp 2, respectivamente;  $P < 0.05$ , Tabla 2.2), pero similar entre los distintos genotipos.

#### **2.3.4. Rendimiento por planta, componentes de rendimiento, y relación entre el número de granos y el crecimiento de la planta y de la espiga alrededor del período crítico**

Tanto el rinde por planta (ca. 161.92 y 147.65 g  $pl^{-1}$  en el Exp 1 y Exp 2, respectivamente) como el NGP (ca. 602 granos y 565 granos en el Exp 1 y Exp 2, respectivamente) resultó superior ( $P < 0.05$ ) durante el Exp 1 que en el Exp 2 (Tabla 2.2). Sin embargo, en ambos experimentos, el incremento de la densidad de siembra redujo el rinde ( $P < 0.001$ ), el NGP ( $P < 0.001$ ) y el peso de grano ( $P < 0.01$ ) (Tabla 2.2). Los híbridos del grupo DK190 en  $D_6$  presentaron mayores NGP que los del DK747 ( $P < 0.001$ , para la interacción H x D; Tabla 2.2), pero un rinde por planta similar, debido a que los granos resultaron ligeramente más livianos ( $P < 0.001$  para la interacción H x D; Tabla 2.2). Dentro de cada grupo de híbridos las diferentes versiones fijaron similares NGP y presentaron medias similares para la variable peso de grano.

Solamente en  $D_6$  los genotipos presentaron cambios en la ER entre experimentos (ca. 255 y 309 granos  $d g^{-1}$  en Exp 1 y Exp 2, respectivamente), mientras que en  $D_{12}$  de ambos experimentos alcanzaron una similar ER (ca. 290 granos  $d g^{-1}$ ) ( $P < 0.1$ , para la interacción E x D, Tabla 2.2). Las versiones

MGRR y RR de ambos híbridos presentaron la menor eficiencia reproductiva tanto en  $D_6$  como en  $D_{12}$  ( $P < 0.001$ ; Tabla 2.2). Cabe destacar que el rango de  $TCP_{PC}$  y  $TCE_{PC}$  explorado en estos experimentos no incluyó valores extremadamente bajos debido a las condiciones de manejo de los cultivos (riego, fertilización, y  $D_{12}$  como máxima densidad de siembra).

Por tal razón se decidió estudiar la respuesta del NGP a las  $TCP_{PC}$  y  $TCE_{PC}$  de las diferentes versiones de ambos grupos de híbridos en un amplio rango de  $TCE_{PC}$  especialmente cubriendo menores valores de este rasgo (Exp 3). Para ello se analizó conjuntamente el set de datos de cada genotipo compuesto por las plantas individuales de los tres experimentos. Bajo este análisis el DK747MGRR presentó la caída más abrupta del NGP a bajas  $TCP_{PC}$  ( $i=336$  granos  $d\ g^{-1}$ ), y el mayor valor umbral de esterilidad ( $j=$  ca.  $2\ g\ d^{-1}$ ) dentro del grupo del DK747 (Fig. 2.1a.). Similarmente, al analizar la respuesta del NGP a la  $TCP_{PC}$  de los híbridos del grupo DK190, el DK190RR presentó la mayor caída del NGP a bajas  $TCP_{PC}$  ( $i=491$  granos  $d\ g^{-1}$ ) y un umbral de esterilidad ( $j=$  ca.  $1,4\ g\ d^{-1}$ ) superior al de las otras dos versiones (Fig. 2.1b.).

Para reducir el efecto de las diferencias genotípicas en la partición de biomasa hacia la espiga durante el período crítico, se analizó la respuesta del NGP a la  $TCE_{PC}$  para el mismo conjunto de datos de los tres experimentos. Las relaciones difirieron principalmente entre versiones dentro de cada grupo. Dentro del grupo DK747, el DK747MGRR presentó nuevamente una menor fijación de granos ante bajas  $TCE_{PC}$  (parámetro  $l$ ) pero también una menor curvi-linealidad ( $n$ ) a altas  $TCE_{PC}$ . Dentro del grupo DK190, el DK190RR también presentó la menor fijación de granos a bajas  $TCE_{PC}$  y un grado de curvi-linealidad intermedio a altas tasas. Consecuentemente, para bajos valores de  $TCE_{PC}$  ambos genotipos evidenciaron los menores valores de ER

(ca. 316 y 344 granos  $d\ g^{-1}$  para el DK747MGRR y DK190RR, respectivamente;  $P < 0,01$ ; Tabla 2.3).

El análisis de las ER para todo el rango explorado de  $TCE_{PC}$ , evidencia los menores valores de ER de las plantas del DK747MGRR y DK190RR (Fig. 2.1 c y f insertos) en comparación con las plantas de las otras versiones particularmente para valores de  $TCE_{PC} < 0.6\ g\ d^{-1}$ . En el grupo de híbridos DK747 los mayores desvíos (RMSE) a la máxima ER (i.e. línea de frontera), correspondieron a las plantas del DK747MGRR (ca. 380 granos  $d\ g^{-1}$ ), seguido por las del DK747RR (ca. 293 granos  $d\ g^{-1}$ ), DK747MG (ca. 279 granos  $d\ g^{-1}$ ) y DK747 (ca. 264 granos  $d\ g^{-1}$ ). Al analizar el RMSE por intervalos de  $TCE_{PC}$  (intervalo 1 =  $TCE_{PC} < 1\ g\ d^{-1}$ ; intervalo 2 =  $1\ g\ d^{-1} < TCE_{PC} < 2\ g\ d^{-1}$ ; intervalo 3 =  $2\ g\ d^{-1} < TCE_{PC} < 3\ g\ d^{-1}$ ; intervalo 4 =  $TCE_{PC} > 3\ g\ d^{-1}$ ), los mayores valores de RMSE se obtuvieron en el intervalo 1 y para este intervalo los mayores desvíos lo presentaron las plantas del DK747MGRR, y los menores las plantas de la versión convencional. En los intervalos 2 y 3 se sostiene esta tendencia pero las diferencias resultaron menores. Finalmente, para el intervalo 4 los valores de RMSE resultaron similares entre las versiones.

El mismo tipo de análisis se realizó para las versiones del DK190. Si bien las diferencias en los desvíos entre versiones resultaron menores que para el DK747, el mayor valor de RMSE lo presentó el DK190MG (ca. 263 granos  $d\ g^{-1}$ ), seguido por el DK190MGRR (ca. 238 granos  $d\ g^{-1}$ ), y por último el DK190RR (ca. 237 granos  $d\ g^{-1}$ día). Al analizarlo por intervalos las mayores diferencias entre versiones se observaron nuevamente en el intervalo 1 y 4 presentando los mayores RMSE el DK190MG en el intervalo 1 y el DK190MGRR, en el intervalo 4.

## 2.4. Discusión

En este capítulo se evaluaron algunos rasgos del crecimiento y del desarrollo de las plantas de maíz de un híbrido simple convencional (DK747) y sus versiones transgénicas (DK747MG, DK747RR y DK747MGRR) y de los transgénicos (DK190MG, DK190RR y DK190MGRR) de otro híbrido simple. Los genotipos fueron cultivados en densidades de siembra contrastantes, para analizar la respuesta al estrés por densidad de siembra de los diversos rasgos y la estabilidad en los mecanismos responsables de la fijación de granos (partición de biomasa hacia las estructuras reproductivas alrededor del período crítico y eficiencia reproductiva). Para algunos de los rasgos, se demostró la existencia de variabilidad fenotípica entre grupos de híbridos y entre las versiones dentro de cada grupo. Algunas de estas diferencias resultaron independientes de la densidad de siembra y/o del ambiente de cada experimento (i.e. posibles respuestas constitutivas), mientras que otras sólo fueron detectadas bajo ciertas condiciones de manejo (i.e. posibles respuestas adaptativas).

La existencia de diferencias en los rasgos del crecimiento y del desarrollo son respuestas esperables entre híbridos convencionales de maíz (Otegui y Melón, 1997; Maddonni et al., 1999; Pagano et al., 2007; Rossini et al., 2011). Contrariamente, las diferencias entre las versiones transgénicas y la versión convencional de un híbrido y entre las versiones transgénicas del mismo híbrido, resultan novedosas sugiriendo un posible rol del o los genes introducidos sobre la fisiología y el fenotipo de una planta.

En ambos experimentos el híbrido DK747MG en alta densidad de siembra exhibió una  $TCP_{RT}$  superior que las restantes versiones del grupo DK747, incluso que el DK747MGRR, el cual exhibió la mayor  $TCP_{RT}$  en baja densidad.

Por lo tanto, estos resultados sugieren una tolerancia en estadíos tempranos al estrés por aumento de densidad del DK747MG (i.e. alta  $TCP_{RT}$  en  $D_{12}$ ) y altas tasas de crecimiento tempranas del DK747MGRR en condiciones potenciales de crecimiento (i.e. alta  $TCP_{RT}$  en  $D_6$ ).

Si bien existen evidencias de diferencias en la tolerancia temprana de híbridos de maíz al incremento de la densidad poblacional (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano et al., 2007), para nuestro conocimiento no existe información de esta naturaleza entre versiones transgénicas y convencionales de un mismo híbrido. En este trabajo no se estudiaron los rasgos fisiológicos determinantes del crecimiento de las plantas, i.e. eficiencia de captura de la radiación solar y eficiencia en el uso de la radiación (Boote y Loomis, 1991). La primera, es dependiente del tamaño del área foliar de las plantas y de su disposición espacial (Maddonni et al., 2001), mientras que la segunda es especie específica (Kiniriy et al., 1989), aunque puede ser alterada por el contenido de N foliar (Sinclair y Horrie, 1989). Para un mismo período fenológico de los cultivos (e.g. período reproductivo temprano), la radiación incidente resultó similar para todos los genotipos, con lo cual las variaciones en la  $TCP_{RT}$  habrían sido originadas por diferencias en la captura y/o en la eficiencia en el uso de la radiación. En un estudio reciente, la versión Bt de un híbrido de maíz presentó una similar concentración de N foliar al inicio del período reproductivo temprano que la versión convencional, pero un mayor crecimiento vegetativo (Subedi y Ma, 2007). Consecuentemente, cambios en la eficiencia de captura de la radiación podrían explicar las variaciones fenotípicas detectadas en el crecimiento temprano de las plantas entre versiones del DK747. Estas diferencias podrían originarse por efectos epistáticos (Falconer, 1981) o

pleiotrópicos (Ge et al., 2004) relacionados con el lugar del genoma en el que se insertó el transgén (Feldmann et al., 1989).

Si bien las diferencias en el crecimiento temprano del maíz podrían conferirle ventajas en términos competitivos con los otros componentes bióticos del agro-ecosistema (e.g. malezas; Rajcan y Swanton, 2001), las mismas deberían sostenerse durante el período crítico y reflejarse en los mecanismos subyacentes del éxito reproductivo de las plantas (i.e. partición de biomasa hacia la espiga y eficiencia reproductiva). Interesantemente, no todos los genotipos con mayor crecimiento en etapas reproductivas tempranas (DK747MG en alta densidad y DK747MGRR en baja densidad) presentaron los mayores valores de  $TCP_{PC}$ . Así, el DK747MGRR y el DK190MGRR presentaron las  $TCP_{PC}$  más altas en ambas densidades de siembra (i.e. respuesta constitutiva) las cuales también se reflejaron en altos valores de  $TCE_{PC}$ . Sin embargo, en ambos materiales se registraron las mayores caídas en la partición de biomasa hacia la espiga para valores extremadamente bajos de  $TCP_{PC}$ , detectándose plantas en las cuales la  $TCE_{PC}$  resultó drásticamente reducida. Diferencias genotípicas en la respuesta de la  $TCE_{CP}$  a la  $TCP_{PC}$  fueron documentadas entre líneas e híbridos de maíz (Echarte y Tollenaar, 2006) y entre híbridos convencionales (Echarte et al., 2004; Pagano et al., 2007, D'Andrea et al., 2008; Rossini et al., 2011) pero esta información nunca fue documentada para diferentes versiones de un mismo híbrido. En maíz la dominancia apical ejercida por la panoja regula la proporción de biomasa que es particionada a la espiga durante el período crítico (Edmeades y Daynard, 1979a). Diversas hormonas están involucradas en la dominancia apical (Thimann y Skoog, 1934; Eliasson, 1975; Blake et al, 1983; Russell y Thimann, 1988; Pilate et al., 1989). Diferencias en la síntesis, acumulación (Cline, 1994)

o sensibilidad a las hormonas que controlan un proceso (Trewavas, 1981; Cline, 1994) pueden afectar las respuestas fisiológicas que lo gobiernan. La introducción de un transgén en el genoma endógeno de las plantas podría afectar ya sea la expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas y de esa forma modificar su contenido final, o bien afectar genes relacionados a la recepción de las señales hormonales modificando la sensibilidad a las mismas. Los resultados de Wang et al. (2012) en arroz permiten postular la primera parte de esta hipótesis. Estos autores detectaron variabilidad en el contenido de algunas hormonas promotoras del crecimiento (AIA, ZT y GA3) entre híbridos y líneas Bt de arroz y su versión convencional. Estas hormonas podrían jugar un rol en la dominancia apical y en la partición de biomasa hacia la espiga. Además, estudios en soja (Elmore et al., 2001, de Vries y Fehr, 2011) demostraron que las líneas transgénicas RR son más altas que las convencionales, reflejando diferencias en la dominancia apical entre las líneas estudiadas.

La existencia de variabilidad fenotípica en la partición de biomasa a la espiga durante el período crítico, no permitió obtener un único modelo por grupo de híbridos para predecir la fijación de granos a partir de la  $TCP_{PC}$  (Andrade et al., 2002) (Fig. 2.1a y d). Sin embargo, la relación entre el NGP y la  $TCE_{PC}$  tampoco resultó única para todos los híbridos (Fig. 2.1c y f) ni para cada grupo, debido a las diferencias registradas en la ER. Echarte et al. (2004) habían mostrado diferencias en la relación entre el NGP y la  $TCE_{PC}$  entre híbridos de maíz de distinta época de liberación en el mercado argentino, pero nunca se habían reportado para versiones transgénicas y no transgénicas de un mismo híbrido. En nuestro estudio el DK747MGRR y el DK190MGRR alcanzaron los menores valores de ER en ambas densidades de siembra.

Cuando se analizó la ER a nivel de planta individual, la menor ER para el DK747MGRR se encontró a bajas TCE<sub>PC</sub>, y a altas TCE<sub>PC</sub> en el DK190MGRR. Estudios previos demuestran que el aborto de los granos es el origen de la baja ER de las plantas más reprimidas del *stand* (i.e. bajas TCE<sub>PC</sub>), y este aborto de granos está determinado por asincronía en la emergencia de estigmas (Otegui et al., 1995, Pagano et al., 2007, Rattalino Edreira et al., 2011). La menor ER a bajas TCE<sub>PC</sub> probablemente esté controlada por este proceso. Por otro lado, las plantas del DK190MGRR que mostraron disminución en la ER pero en altas TCE<sub>PC</sub> (Fig.2.1f inserta). Estudios específicos del efecto de la introducción de transgenes en el desarrollo floral podrían esclarecer las bases fisiológicas de estas diferencias. Poder identificar las bases fisiológicas y génicas de la partición de biomasa y de la eficiencia reproductiva resultaría de interés para poder incrementar el éxito reproductivo de las plantas de maíz.

El efecto de la introducción genes sobre la el tiempo a floración fue previamente reportada (Ma y Subedi, 2005). En el mencionado trabajo, los maíces Bt exhibieron mayor tiempo a *silking* que la contraparte convencional. En este trabajo, en la densidad más baja, la versión Bt del DK747 mostró un mayor TT a *silking* que la versión convencional, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Interesantemente, el transgénico DK747RR adelantó el tiempo a floración en todas las condiciones exploradas (i.e. respuesta constitutiva). Este resultado es una evidencia novedosa del efecto de transgenes sobre el desarrollo de las plantas de maíz. Es interesante destacar que este genotipo no presentó un menor número de hojas o un mayor ritmo de aparición de hojas (i.e. filocrono, datos no presentados) que determinen su mayor precocidad (Tollenaar et al., 1979). Este carácter podría también estar regulado por cambios en la síntesis de hormonas. Por el

contrario el DK190RR sólo resultó más precoz en alta densidad en uno de los experimentos. Por otro lado las versiones con genes apilados no modificaron el tiempo a floración, sugiriendo una posible interacción de ambos transgenes sobre el desarrollo floral.

## **2.5. Conclusiones**

La introducción de eventos transgénicos altera de alguna manera el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz en distintos aspectos eco-fisiológicos, en ausencia de adversidades bióticas (plagas y malezas) y deficiencias hídrico-nutricionales. Por ejemplo, el DK747RR mostró consistentemente un menor tiempo a *silking* que el DK747 y el DK747MG, pero ambos, el DK190MG y el DK190RR mostraron similar duración de esa etapa. Entonces, no solamente el evento transgénico sino además el lugar de inserción y el fondo genético podrían tener un rol en la expresión de las diferencias fenotípicas mencionadas. Entre las variables de crecimiento, ambas versiones apiladas (DK747MGRR y DK190MGRR) presentaron altas tasas de crecimiento de la espiga durante el período crítico pero baja eficiencia reproductiva. Investigar las bases fisiológicas y genéticas de estas diferencias sería de interés para poder incrementar el éxito reproductivo de los cultivos de maíz.

## **CAPÍTULO 3**

# **Comparación de la variabilidad fenotípica en híbridos convencionales y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.)**

### 3.1. Introducción

Bajo un enfoque poblacional, el rendimiento del cultivo de maíz es la sumatoria del rendimiento individual de cada una de las plantas que lo conforman. Varios trabajos señalan que los cultivos de maíz ante la incidencia de un estrés abiótico presentan una mayor variabilidad en el rendimiento y el NGP que el peso de los granos o su composición, existiendo diferencias genotípicas en estas respuestas (Edmeades y Daynard, 1979a; Echarte et al., 2000; Vega y Sadras, 2003; Maddonni y Otegui, 2006; Boomsma et al., 2009; Caviglia et al., 2011; Mayer et al., 2012). Es decir que, en altas densidades de siembra, las plantas de un *stand* difieren principalmente en su habilidad para fijar granos, mientras que el peso de los granos y su calidad resultan ligeramente afectados. Sin embargo aún no resulta del todo claro el origen de dicha variabilidad, pudiendo originarse por diferencias ambientales percibidas por las plantas (e.g. parches temporales o espaciales de mayor o menor oferta de recursos), diferencias genéticas, o ambas conjuntamente.

En el capítulo anterior se demostró que la introducción de eventos transgénicos en maíz altera de alguna manera el crecimiento y el desarrollo de las plantas en distintos aspecto eco-fisiológicos. En este capítulo se analizará el efecto de la introducción de genes sobre la variabilidad poblacional de estos rasgos (i.e. variabilidad fenotípica). La cuantificación de la variabilidad fenotípica puede realizarse a través de diferentes descriptores estadísticos poblacionales, como por ejemplo el coeficiente de variación (CV). En maíz, se ha documentado una asociación negativa entre el CV del rendimiento medio de las plantas y el rendimiento por unidad de área (Tollenaar y Wu, 1999), indicando que el incremento del CV es una señal de la penalidad del rendimiento a nivel de cultivo y que puede ser utilizado para caracterizar el

grado de intolerancia de un genotipo a distintos estreses abióticos. Sin embargo, el CV no aporta información sobre el patrón de distribución de frecuencias de un rasgo. Es por ello que el análisis poblacional que incorpora otros estadísticos descriptivos como la curtosis (i.e. el grado de concentración de los datos en la región central de la distribución) y la asimetría (i.e. el grado de normalidad de los datos alrededor de la media aritmética), permite hacer inferencias sobre las interrelaciones entre las plantas del *stand* para interpretar la naturaleza de la competencia por recursos, el impacto de la variabilidad poblacional sobre el rendimiento de un cultivo y el grado de tolerancia de un genotipo a los estrés abióticos (Vega y Sadras, 2003; Mayer et al., 2012).

Los objetivos de este capítulo fueron: (i) analizar el impacto de un estrés por densidad de siembra (i.e. estrés por luz) sobre la variabilidad fenotípica de los diversos rasgos en estudio; y (ii) comparar la variabilidad fenotípica entre las versiones de un mismo híbrido.

### **3. 2. Materiales y métodos**

En este capítulo se presenta la variabilidad fenotípica de diversos rasgos de crecimiento y desarrollo cuantificados en los Exp 1, Exp 2 y Exp 3. Para ello se utilizaron distintos estadísticos descriptivos poblacionales.

#### **3.2.1. Cuantificación de la variabilidad fenotípica a partir del CV y su respuesta al estrés por luz**

Los CV de los Exp 1 y Exp 2, se calcularon a partir de los valores de cada rasgo medidos en las plantas marcadas de cada parcela. Los valores promedio de los rasgos y sus CV del Exp 3, se obtuvieron a partir de los datos de las

plantas de la primera hilera, las plantas de la segunda hilera, y las plantas de las hileras tercera + cuarta.

Para el cálculo del CV de la fecha de antesis y  $R_1$ , la fecha de cada uno de los eventos de las plantas individuales fue referida a la del día anterior en que la primera planta de la parcela alcanzó dichos estados (día 0). Debido a que el ASI puede adquirir valores negativos y el valor promedio del mismo puede resultar igual a cero, resulta imposible estimar el CV con los valores individuales de cada planta. Por lo tanto, la variabilidad fenotípica de este rasgo se estimó a partir del CV de los valores individuales de ASI corregidos. Para corregirlos el valor más negativo o 0 de cada parcela fue fijado en 1 (uno), y el resto de los ASI de las demás plantas fueron modificados acordemente.

Los CV de los Exp 1 y Exp 2 fueron analizados mediante ANOVA, tal como se realizó para el análisis de las medias de cada rasgo (Capítulo 2), previa transformación arco seno en el caso de no cumplirse el supuesto de normalidad.

Con el objetivo de determinar el efecto del aumento de la presión de competencia por luz sobre la variabilidad fenotípica, se ajustaron funciones exponenciales negativas para el conjunto de datos (Exp 1, Exp 2 y Exp 3) de cada genotipo entre los CVs y los valores promedios de los rasgos que exhibieron mayor variabilidad (Ec. 3.1).

$$CV = (o - p) e^{(-qx)} + p \quad (\text{Ec } 3.1)$$

donde  $x$  es el valor promedio del rasgo,  $o$  es el valor al que tiende el CV del rasgo cuando  $x$  se aproxima a 0,  $p$  es el mínimo CV alcanzado y  $q$  es un coeficiente que caracteriza la disminución del CV en respuesta al incremento del valor medio del rasgo.

Los ajustes fueron realizados para las diferentes versiones de cada grupo de híbridos con el programa GraphPadPrism 5 para Windows, y los modelos obtenidos se compararon mediante un test de F.

### **3.2.2. Cuantificación de la variabilidad fenotípica a partir de descriptores estadísticos poblacionales**

Se realizó un análisis de las distribuciones poblacionales de diversos rasgos, ( $TCP_{PC}$ ,  $TCE_{PC}$ , ER, NGP, rinde por planta y TT a floración) para cada una de las versiones de los híbridos DK747 y DK190 en cada densidad de siembra (datos de Exp 1 y Exp 2). Con tal fin, se realizaron histogramas de distribución de frecuencias de los diferentes rasgos mencionados anteriormente. Todos los histogramas se realizaron con el programa GraphPadPrism 5 para Windows. Estas distribuciones fueron ajustadas en primer término con una función gaussiana. Las curvas ajustadas fueron comparadas entre las versiones según el valor de amplitud, media y desvío estándar, con el programa GraphPadPrism 5 para Windows, mediante un test de F.

A partir de las distribuciones de frecuencias, se realizó un análisis de la estadística descriptiva. Para determinar la normalidad de los datos se realizó un test de Shapiro-Wilks, y se analizaron los coeficientes de asimetría ( $g_1$ ) y curtosis ( $g_2$ ). Brevemente, el coeficiente de asimetría permite analizar si la distribución de los datos se encuentra desviada de la media aritmética. Esto implica que un desvío por asimetría positiva, describe una distribución en la cual la mayoría de los datos se concentran en valores más bajos, y unos pocos, en valores más altos. Por el contrario, una distribución asimétrica negativa implica que la mayoría de los individuos de la población se concentran en valores más altos, y unos pocos individuos lo hacen en valores bajos del

carácter que se analiza. El coeficiente de curtosis indica si la distribución de los datos se encuentra concentrada en algunos valores (en ese caso se trata de un coeficiente de curtosis positivo), o si se distribuye a lo largo de un mayor rango de los valores presentados y en menores proporciones en cada intervalo (coeficiente de curtosis negativo). Se consideró rechazada la hipótesis nula del test de normalidad (población normalmente distribuida) cuando  $P < 0.05$ , y se consideraron significativas las desviaciones de la normalidad de los coeficientes de curtosis y asimetría cuando los mismos resultaron mayores a 0.5 o menores a -0.5 (Mayer et al., 2012).

### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Variabilidad fenotípica (cuantificada con el CV) en híbridos de maíz y su respuesta a la presión de competencia**

Para la mayoría de los rasgos en estudio ( $TCP_V$ ,  $TCP_{RT}$ ,  $TCP_{PC}$ ,  $TCE_{PC}$ ,  $NGP$ ,  $ER$ , Rinde) la variabilidad fenotípica cuantificada a partir del CV se incrementó significativamente ( $0.01 < P < 0.1$ ) en  $D_{12}$ , mientras que para el resto de los caracteres se observó la misma tendencia, pero las diferencias entre densidades no resultaron significativas (Tabla 3.1). Algunos rasgos exhibieron una mayor variabilidad ( $0.01 < P < 0.1$ ) durante el  $Exp_1$  (CVs 0.17, 0.18, 0.16 y 0.21 para  $TCE_{PC}$ ,  $PBE_{PC}$ ,  $ER$  y rinde, respectivamente) que durante el  $Exp_2$  (CVs 0.14, 0.17, 0.14 y 0.15, para  $TCE_{PC}$ ;  $IP_{PC}$ ;  $ER$  y rinde, respectivamente).

En ambos experimentos se detectaron diferencias entre genotipos de un mismo grupo de híbridos en la variabilidad fenotípica de los diversos rasgos. Así, en el  $Exp_1$  el DK747 presentó el mayor CV de la  $TCP_V$  (0.29) dentro del grupo DK747 (ca. 0.22 para el resto de las versiones), mientras que en el  $Exp_2$  el DK747MGRR alcanzó el mayor valor de este rasgo (CVs= 0.35 y ca. 0.24

Tabla 3.1 CV de las TCP<sub>V</sub>, TCP<sub>RT</sub> y TCP<sub>PC</sub>, TCE<sub>PC</sub>, PBE<sub>PC</sub>, BE. BT<sup>-1</sup>, IC, NGP, rinde, peso de grano, ER, TT antesis, TT *silking* y ASI de los híbridos DK747 y sus versiones transgénicas, y las versiones transgénicas del DK190, cultivadas en dos densidades. Los valores representan los CVs de cada tratamiento en los Exp 1 y Exp 2.

Híbrido	Densidad pl m <sup>-2</sup>	TCP <sub>V</sub>	TCP <sub>RT</sub>	TCP <sub>PC</sub>	TCE <sub>PC</sub>	PBE <sub>PC</sub>	BE.BT <sup>-1</sup>	IC	NGP	Rinde	Peso de grano	ER	TT antesis	TT <i>silking</i>	ASI
DK747	6	0,22	0,18	0,14	0,11	0,16	0,03	0,04	0,10	0,10	0,09	0,14	0,43	0,45	0,31
DK747MG	6	0,19	0,15	0,14	0,14	0,21	0,04	0,03	0,09	0,12	0,10	0,13	0,39	0,45	0,35
DK747RR	6	0,26	0,20	0,13	0,17	0,17	0,04	0,05	0,07	0,10	0,08	0,17	0,45	0,52	0,33
DK747MGRR	6	0,22	0,19	0,13	0,10	0,14	0,03	0,04	0,10	0,08	0,08	0,10	0,37	0,42	0,40
DK190MG	6	0,29	0,21	0,16	0,15	0,19	0,14	0,11	0,17	0,17	0,13	0,16	0,46	0,49	0,35
DK190RR	6	0,28	0,18	0,15	0,15	0,17	0,04	0,05	0,20	0,15	0,14	0,15	0,45	0,48	0,37
DK190MGRR	6	0,27	0,20	0,17	0,13	0,20	0,08	0,08	0,16	0,15	0,17	0,14	0,39	0,43	0,39
DK747	12	0,24	0,20	0,24	0,19	0,17	0,08	0,09	0,24	0,25	0,10	0,16	0,49	0,50	0,38
DK747MG	12	0,21	0,20	0,19	0,15	0,16	0,03	0,03	0,14	0,16	0,09	0,14	0,45	0,47	0,33
DK747RR	12	0,27	0,23	0,20	0,21	0,19	0,09	0,06	0,17	0,41	0,12	0,19	0,53	0,52	0,34
DK747MGRR	12	0,33	0,21	0,25	0,17	0,32	0,04	0,04	0,17	0,20	0,11	0,15	0,49	0,58	0,47
DK190MG	12	0,37	0,22	0,19	0,18	0,21	0,14	0,16	0,19	0,24	0,12	0,20	0,41	0,58	0,44
DK190RR	12	0,27	0,19	0,16	0,15	0,16	0,06	0,07	0,15	0,19	0,15	0,14	0,37	0,40	0,34
DK190MGRR	12	0,28	0,22	0,18	0,17	0,17	0,03	0,04	0,15	0,18	0,12	0,16	0,41	0,52	0,44

Nivel de significancia de los efectos principales e interacciones

Experimento (E)					*	†				†					
Densidad (D)	†	*	*		†				*	*		**			
E x D												*			
Híbrido (H)	*						**		**		***				
H x E	†														
H x D					†				***		†				
H x E x D															

† Nivel de significancia P<0,1

\* Nivel de significancia P<0,05

\*\* Nivel de significancia P<0,01

\*\*\* Nivel de significancia P<0,001

para el DK747MGRR y el resto de las versiones, respectivamente; interacción ExH,  $P < 0.1$ ). En ambos experimentos, el DK747MGRR en  $D_{12}$  presentó un mayor CV de la  $TCP_{PC}$  (ca. 0.25) que el DK747MG (ca. 0.19; interacción HxD,  $P < 0.1$ ). Sin embargo, para esta densidad el DK747 presentó el mayor CV del NGP (0.24 y ca. 0.16 para el DK747 y el resto de las versiones, respectivamente; interacción HxD,  $P < 0.001$ ). Las distintas versiones transgénicas del DK190 no difirieron entre sí en los CVs de  $TCP_V$  (ca. 0.30),  $TCP_{RT}$  (ca. 0.21),  $TCP_{PC}$  (ca. 0.17), y del NGP (ca. 0.17) pero sí en los CVs del  $BE.BT^{-1}$  presentando el mayor valor el DK190MG (0.14 y ca. 0.05 para el DK190MG y el resto de las versiones, respectivamente).

Al analizar la respuesta de la variabilidad fenotípica de los distintos rasgos, a los cambios en los valores medios de los mismos originados por la presión de competencia, no se observó ninguna tendencia para la  $TCP_{RT}$  y la ER (datos no presentados). Contrariamente, los CV de la  $TCP_{PC}$ , la  $TCE_{PC}$ , del NGP y del rinde se incrementaron significativamente en respuesta a la disminución de los valores medios de estos rasgos (Fig. 3.1;  $0.49 < r^2 < 0.95$ ).

No se observaron diferencias entre híbridos del grupo DK190 en la respuesta de los CVs de la  $TCP_{PC}$ ,  $TCE_{PC}$ , el NGP y el rinde a los cambios del valor medio de estos rasgos (Fig. 3.1e, f, g, y h). Similarmente, se encontró una única respuesta de los CVs de la  $TCP_{PC}$  (Fig. 3.1a) y el NGP (Fig. 3.1c) a los valores medios de estos rasgo para los híbridos del grupo DK747.

Por el contrario, se detectaron diferencias entre los híbridos del grupo DK747 en las respuestas del CV de la  $TCE_{PC}$  y del rinde ante cambios en los valores medios de estos rasgos. Por ejemplo, las variaciones del CV de la  $TCE_{PC}$  del DK747MGRR (Fig. 3.1b;  $r^2 \geq 0.74$ ) resultaron menos abruptas que las de las restantes versiones ( $q = 0.99$  para la versión MGRR vs. 2.66 para las

Figura 3.1.

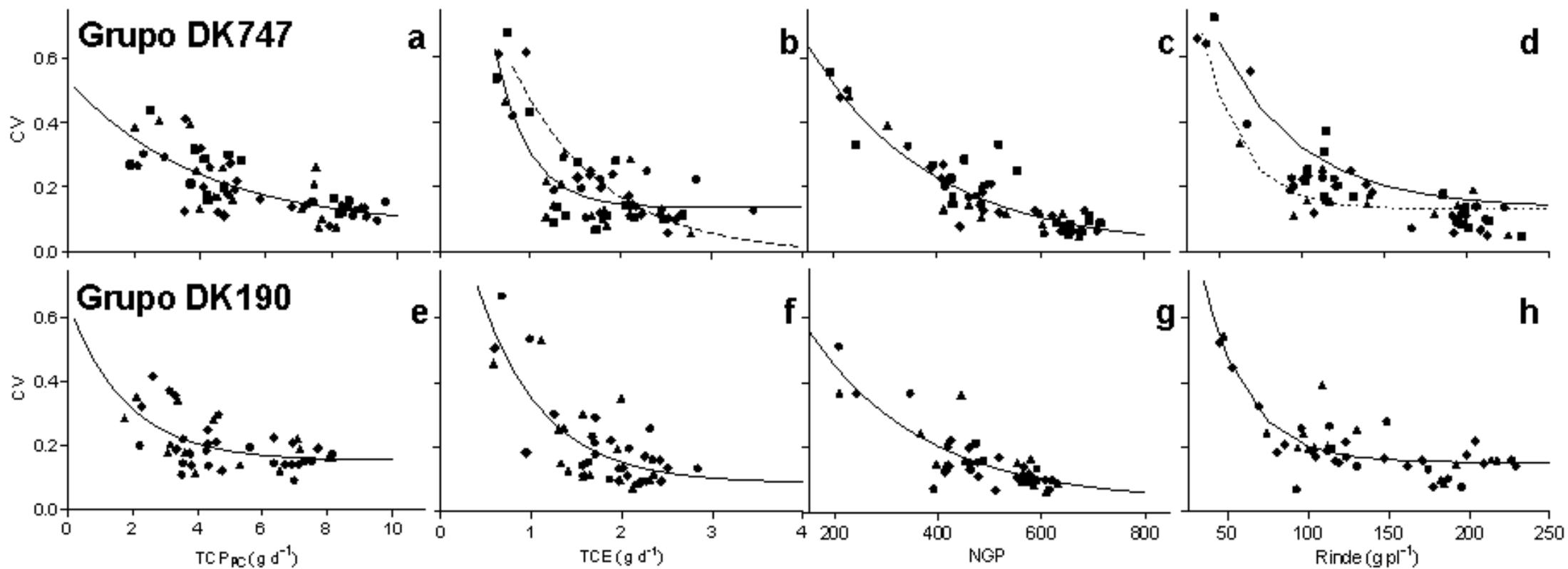


Figura 3.1. Relaciones entre el coeficiente de variación (CV) de la  $TCP_{PC}$  (a, e),  $TCE_{PC}$  (b, f),  $NGP$  (c, g) y  $Rinde$  (d, h) y sus respectivos valores medios, para los híbridos DK747 (a, b, c, d) y DK190 (e, f, g, h). Símbolos: cuadrados (DK747); triángulos (DK747MG y DK190MG); círculos (DK747RR y DK190RR); rombos (DK747MGRR y DK190MGRR). Las líneas representan los ajustes de las relaciones: en (a) línea llena para todas las versiones del grupo DK747 ( $\sigma = 0.53$ ;  $p = 0.076$ ;  $q = 0.257$ ;  $r^2 = 0.51$ ;  $n = 60$ ). En (b) línea continua para los conjuntos de datos de las versiones DK747, DK747MG y DK747RR ( $\sigma = 2.55$ ;  $p = 0.14$ ;  $q = 2.66$ ;  $r^2 = 0.79$ ;  $n = 45$ ), y línea punteada para el DK747MGRR ( $\sigma = 1.28$ ;  $p = -0.01$ ;  $q = 0.99$ ;  $r^2 = 0.92$ ;  $n = 15$ ). En (c) línea llena para todas las versiones del grupo DK747 ( $\sigma = 1.19$ ;  $p = 0.01$ ;  $q = 0.004$ ;  $r^2 = 0.83$ ;  $n = 60$ ). En (d) línea llena para las versiones DK747, DK747RR y DK747MGRR ( $\sigma = 1.47$ ;  $p = 0.07$ ;  $q = 0.02$ ;  $r^2 = 0.90$ ;  $n = 45$ ) y línea punteada para la versión DK747MG ( $\sigma = 3.24$ ;  $p = 0.13$ ;  $q = 0.04$ ;  $r^2 = 0.93$ ;  $n = 15$ ). En (e) línea llena para todas las versiones del grupo DK190 ( $\sigma = 0.65$ ;  $p = 0.152$ ;  $q = 0.64$ ;  $r^2 = 0.49$ ;  $n = 45$ ). En (f) línea llena para todas las versiones del grupo DK190 ( $\sigma = 1.16$ ;  $p = 0.09$ ;  $q = 1.41$ ;  $r^2 = 0.61$ ;  $n = 45$ ). En (g) línea llena para todas las versiones del grupo DK190 ( $\sigma = 1.06$ ;  $p = 0.03$ ;  $q = 0.004$ ;  $r^2 = 0.70$ ;  $n = 45$ ). En (h) línea llena para todas las versiones del grupo DK190 ( $\sigma = 2.24$ ;  $p = 0.15$ ;  $q = 0.04$ ;  $r^2 = 0.71$ ;  $n = 45$ ).

versiones convencional, -Bt y -RR, respectivamente) y alcanzaron mayores valores para  $TCE_{PC} < 2 \text{ g día}^{-1}$  y una tendencia a menores valores para  $TCE_{PC} > 2 \text{ g día}^{-1}$  (i.e. menor valor del plateau;  $p = -0.01$  para el DK747MGRR vs.  $p = 0.13$  para el DK747, DK747MG y DK747RR). Por otro lado, el DK747MG mostró menores CV del rinde en todo el rango de rindes explorado (Fig. 3.1d), pero un incremento brusco a bajos rindes ( $q = 0.04$  para el DK747MG vs.  $q = 0.02$  para el DK747, el DK747RR y el DK747MGRR).

### **3.3.2. Estudio poblacional de la variabilidad fenotípica**

#### **3.3.2.1. Rasgos del crecimiento**

La distribución de la biomasa total en  $R_6$  de los genotipos del grupo DK747 en  $D_6$  resultó normal para las versiones transgénicas ( $0.05 < P < 0.62$ ; Tabla 6.1.) y distinta de la normalidad para la versión convencional ( $P = 0.04$ ) evidenciando una ligera asimetría negativa ( $g_1 = -0.8$ ). Sin embargo en  $D_{12}$  las distribuciones de los datos de este rasgo resultaron normales ( $0.19 < P < 0.69$ ) para todas las versiones (Tabla 6.1.).

Dentro del grupo del DK190, en baja densidad la biomasa total en  $R_6$  presentó una distribución normal en el DK190MG y el DK190RR, mientras que el DK190MGRR exhibió una distribución alejada de la normalidad con una leve asimetría positiva ( $g_1 = 0.71$ ). Ante incrementos de la densidad de siembra, tanto el DK190RR como el DK190MGRR presentaron distribuciones normales mientras que el DK190MG presentó una distribución no normal con asimetría negativa ( $g_1 = -0.83$ ) y fuertemente leptocúrtica ( $g_2 = 2.15$ ).

Dentro del grupo DK747 y para el rasgo  $TCP_{PC}$  el DK747 presentó en ambas densidades una distribución distinta de la normal con asimetría ligeramente positiva ( $g_1 = 0.54$  y  $0.80$  en  $D_6$  y en  $D_{12}$ , respectivamente), mientras que el

DK747MG en  $D_{12}$ , y el DK747RR y DK747MGRR en  $D_6$  y  $D_{12}$  presentaron distribuciones normales. Por otro lado, la distribución de las  $TCP_{PC}$  del DK747MG en  $D_6$  resultó alejada de la normalidad, fuertemente leptocúrtica ( $g_2=1.67$ ) y con una leve asimetría negativa ( $g_1=-0.61$ ).

Para los genotipos del grupo DK190, en ninguna de las densidades estudiadas se detectaron diferencias entre las versiones en las medidas de dispersión de los datos de la  $TCP_{PC}$ . En  $D_{12}$ , el DK190MG fue el único genotipo que presentó desvíos de la normalidad con una fuerte asimetría positiva ( $g_1=1.23$ ;  $P=0.00$ ) (Tabla 6.1.).

La comparación de los parámetros de dispersión ajustados al conjunto de datos de la  $TCE_{PC}$  del grupo DK747, reveló que la versión convencional en  $D_6$  presentó un mayor desvío estándar que el DK747MG y DK747MGRR ( $0.0001 < P < 0.003$ , Fig. 3.2a.), y el DK747MG mostró menores desvíos que el DK747RR ( $P < 0.0001$ ). En  $D_{12}$  las diferencias se debieron principalmente a cambios en las medias aritméticas. En  $D_6$  solamente la versión DK747MGRR presentó una distribución normal de las  $TCE_{PC}$  ( $P=0.95$ ), mientras que las demás versiones se alejaron de la normalidad y presentaron coeficientes de asimetría fuertemente positivos ( $g_1=1.33$  y  $1.11$  para el DK747 y DK747MG, respectivamente). Por el contrario, en  $D_{12}$  todas resultaron normales ( $0.05 < P < 0.44$ ) (Tabla 6.1).

Figura 3.2. Distribución de frecuencias de las TCE<sub>PC</sub> para los híbridos del grupo DK747 (a) y DK190 (b) en D<sub>6</sub> y D<sub>12</sub>. Los puntos representan la distribución de frecuencias de la población total y las líneas representan los ajustes a una curva gaussiana de los puntos. Las barras grises representan la distribución de frecuencias de las plantas dominadas, y las barras blancas, la de las plantas dominantes del stand.

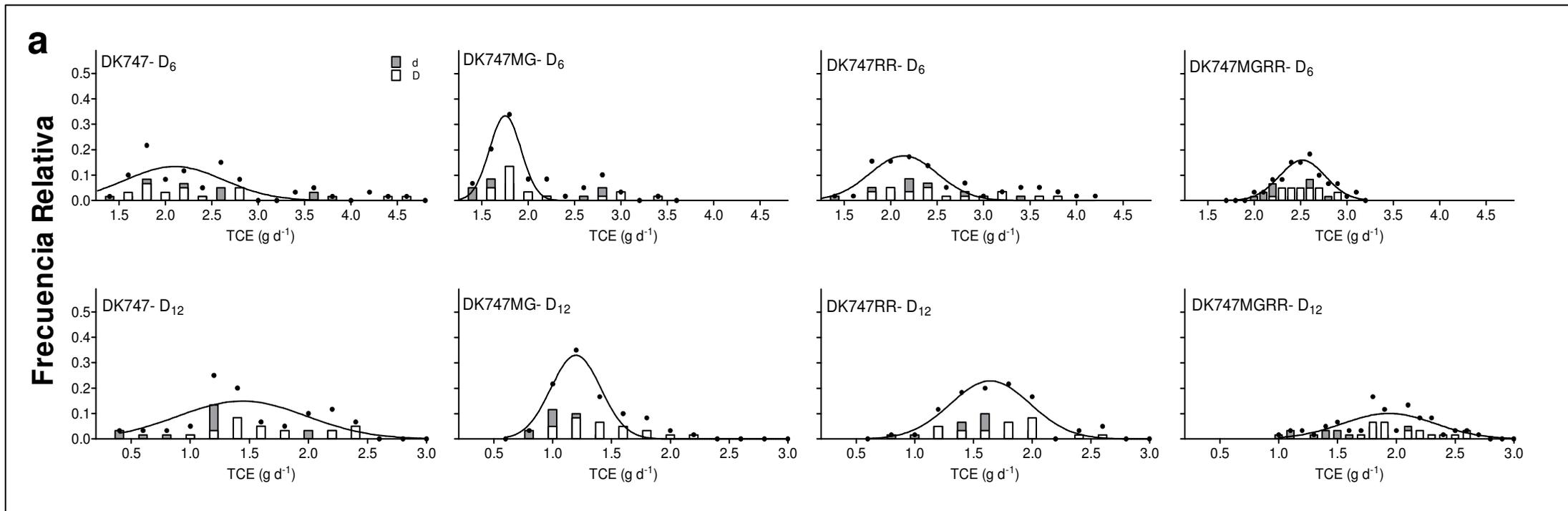
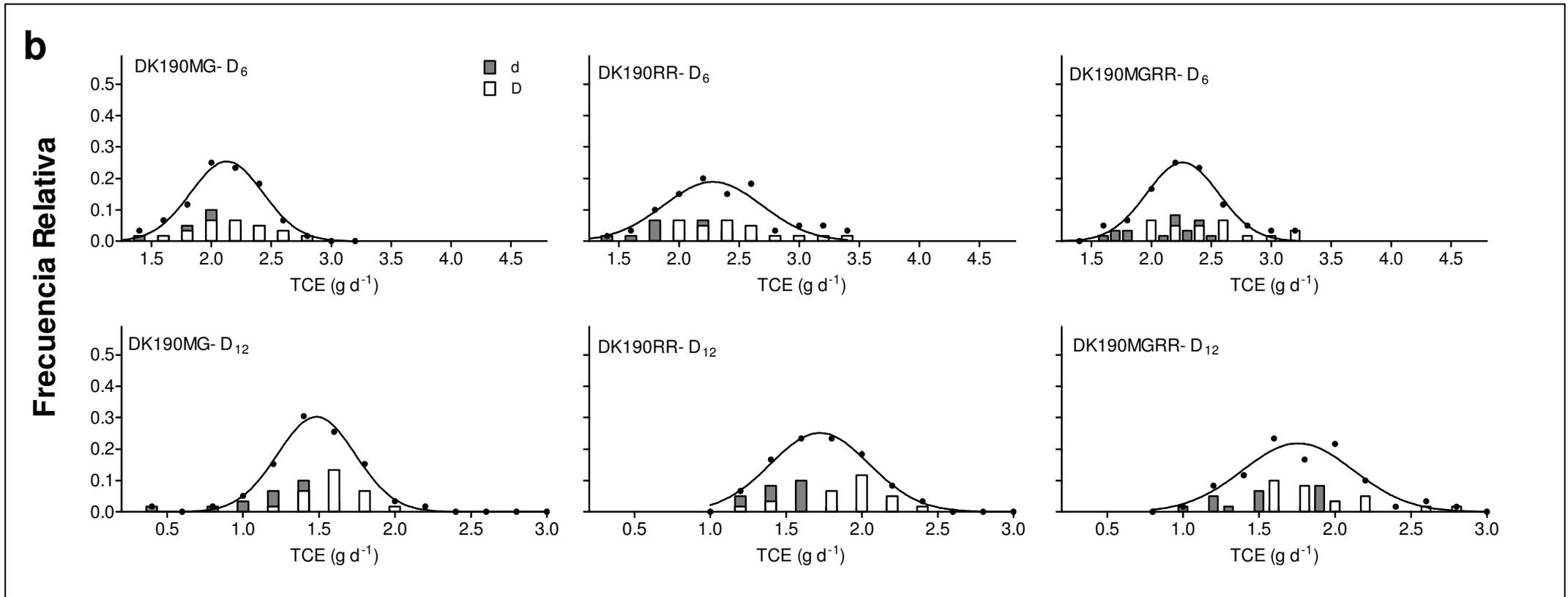


Fig.3.2. (continuación)



Por el contrario, en el grupo del DK190, las únicas diferencias encontradas en los parámetros de dispersión de la  $TCE_{PC}$  se detectaron en  $D_{12}$ . El DK190MG presentó menor desvío estándar en comparación con el DK190RR y DK190MGRR ( $P < 0.0001$  en ambos casos, Fig. 3.2b.), y mayor amplitud que el DK190MGRR, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los ajustes de las versiones DK190RR y DK190MGRR. El DK190MG en  $D_6$  presentó desvíos de la normalidad con una distribución asimétrica positiva y fuertemente leptocúrtica ( $g_1 = 1.11$  y  $g_2 = 5.74$ , Fig. 3.2b.).

### 3.3.2.2. Rasgos del desarrollo y del rendimiento

Entre los aspectos relacionados con el desarrollo del grupo de híbridos DK747, la distribución de frecuencias del TT a antesis en  $D_6$  solamente resultó normal para el DK747RR ( $P = 0.33$ ) (Tabla 6.1.) aunque exhibió una curtosis positiva ( $g_2 = 1.3$ ) y asimetría negativa ( $g_1 = -0.72$ ). Por otro lado, en  $D_{12}$ , las distribuciones del DK747 y DK747MG resultaron normales ( $0.05 < P < 0.06$ ) mientras que las de las versiones DK747RR y DK747MGRR presentaron distribuciones platicúrticas ( $g_2 = -0.54$  y  $-0.75$  para las versiones -RR y -BtRR, respectivamente) (Tabla 6.1.).

Entre las versiones del DK190, solamente el DK190MGRR en  $D_{12}$  presentó una distribución normal del TT a antesis ( $P = 0.09$ , Tabla 6.1.). El DK190MG y el DK190RR mostraron distribuciones platicúrticas del TT a antesis en  $D_6$  ( $g_2 = -0.71$  y  $-0.61$ , respectivamente) mientras que en  $D_{12}$  el DK190MG presentó una distribución leptocúrtica ( $g_2 = 0.89$ ; Tabla 6.1.) y asimétrica positiva.

Para el TT a *silking* en  $D_6$ , la normalidad se confirmó para el conjunto de datos del DK747MG ( $P = 0.07$ ) y en  $D_{12}$  para las tres versiones transgénicas

(Tabla 6.1.). El DK747MG, en ambas densidades presentó curvas de menor amplitud que las restantes versiones ( $P= 0.02$  y  $0.0009$  para  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente contra el convencional;  $P= 0.005$  y  $0.0013$  para  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente contra el DK747RR;  $P= 0.015$  y  $0.0009$  para  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente contra el DK747MGRR). La versión DK747RR en baja densidad y el DK747MGRR en  $D_{12}$  presentaron distribuciones leptocúrticas y asimetrías positivas.

Entre las versiones del DK190, el DK190MGRR presentó una distribución normal en  $D_6$  del TT a *silking* ( $P= 0.07$ , Tabla 6.1.), mientras que esa misma versión en  $D_{12}$  y el resto de las versiones en ambos tratamientos de densidad, mostraron desvíos de la normalidad en la distribución de las poblaciones ( $0.00 < P < 0.02$ , Tabla 6.1.). Los desvíos más importantes los presentó la versión DK190MG en  $D_{12}$ , con una marcada distribución asimétrica positiva y fuertemente leptocúrtica ( $g_1= 2.57$ ,  $g_2= 10.15$ , Tabla 6.1.).

El DK747MGRR en  $D_6$  presentó una menor dispersión de los valores de ER que las restantes versiones ( $P < 0.0001$  para las comparaciones contra el DK747MG y DK747RR,  $P= 0.002$  para la comparación con el DK747), así como también en  $D_{12}$  ( $P < 0.0001$  para la comparación con el DK747 y DK747MG). En esta densidad, la amplitud del DK747RR resultó menor a la del DK747 ( $P < 0.0001$ ). En  $D_6$  la distribución de los valores de ER resultó normal para el DK747, DK747MG y DK747MGRR ( $0.06 < P < 0.81$ , Tabla 6.1.). Por el contrario en  $D_{12}$ , sólo el DK747MG y DK747MGRR presentaron distribuciones normales ( $P= 0.88$  y  $P= 0.50$ , respectivamente).

Las curvas de distribución de ER de las tres versiones del DK190 se superpusieron entre los tratamientos de densidad, dentro de cada versión. La distribución del DK190MG en  $D_6$  resultó fuertemente leptocúrtica ( $P= 0.01$ ,  $g_2=$

1.97, Tabla 6.1.) y para el DK190RR en  $D_{12}$ , leptocúrtica y asimétrica positiva ( $P= 0.01$ ,  $g_1= 0.92$ ,  $g_2= 1.67$ , Tabla 6.1.), indicando en ambos casos una baja variación de la ER entre las plantas de la población, y en el caso del DK190RR en  $D_{12}$ , un desvío debido a la presencia de un pequeño grupo de plantas con mayor ER que la mayor parte de la población.

En ambas densidades y para el rasgo rinde por planta, el DK747 presentó mayor amplitud que las versiones restantes ( $P < 0.0001$  y  $P = 0.0009$  para  $D_6$  y  $D_{12}$  respectivamente en comparación con el DK747MG;  $P < 0.0001$  y  $P = 0.0003$  para  $D_6$  y  $D_{12}$  respectivamente en comparación con el DK747RR; y  $P = 0.005$  y  $P < 0.0001$  para  $D_6$  y  $D_{12}$  respectivamente en comparación con el DK747MGRR, Fig. 3.3a.). Por el contrario, no se detectaron diferencias entre las versiones transgénicas ni en la amplitud ni en el desvío estándar de los ajustes realizados. Las distribuciones de los rindes en  $D_6$  para el DK747RR y el DK747MGRR resultaron normales ( $0.4 < P < 0.65$ , Tabla 6.1.), mientras que las del DK747 y DK747MG exhibieron una fuerte curtosis positiva ( $g_2=1.56$  y  $1.32$ , para el DK747 y el DK747MG, respectivamente). Por el contrario en  $D_{12}$  la distribución de frecuencia de los rindes de todas las versiones resultaron normales ( $0.09 < P < 0.86$ ).

Para el caso de los genotipos del grupo DK190, en ambas densidades el DK190MG presentó mayor amplitud en la distribución de frecuencia de los rindes que las restantes versiones ( $P < 0.0001$  y  $P = 0.0002$  en  $D_6$  y  $D_{12}$  en comparación con el DK190RR y  $P < 0.0001$  en  $D_6$  y  $D_{12}$  en comparación con el DK190MGRR, Fig. 3.3b.). El DK190RR en  $D_6$  exhibió una amplitud menor y un desvío estándar mayor que el DK190MGRR ( $P = 0.021$ ) y distribuciones normales en ambas densidades ( $P = 0.81$  y  $0.62$  en  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente, Tabla 6.1.). Por el contrario el DK190MG presentó distribuciones asimétricas

negativas y leptocúrticas en ambas densidades ( $g_1 = -1.19$ ,  $g_2 = 6.09$  para  $D_6$  y  $g_1 = -1.22$ ,  $g_2 = 3.06$  para  $D_{12}$ , Tabla 3.2), mientras que la del DK190MGRR resultó normal en  $D_{12}$  ( $P = 0.2$ , Tabla 6.1.) pero con una asimetría positiva y leptocúrtica ( $g_1 = 0.81$ ,  $g_2 = 0.68$ , Tabla 6.1.) en baja densidad.

La distribución de frecuencias del NGP del DK747MG en  $D_{12}$  ( $P = 0.29$ ) y del DK747RR en ambos tratamientos de densidad ( $P = 0.84$  y  $0.42$  para  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente, Tabla 6.1.) resultaron normales. Por el contrario, el DK747, el DK747MG y el DK747MGRR en  $D_6$  exhibieron distribuciones leptocúrticas ( $g_2 = 4.92$ ,  $3.02$  y  $2.19$  para el DK747, el DK747MG y el DK747MGRR, respectivamente) con una fuerte asimetría positiva en el DK747 ( $g_1 = 1.36$ ), mientras que en  $D_{12}$  el DK747 y el DK747MGRR presentaron distribuciones asimétricas negativas ( $g_1 = -0.83$  y  $-1.02$  para el DK747 y para el DK747MGRR, respectivamente) y leptocúrticas ( $g_2 = 1.51$  y  $1.04$  para el DK747 y para el DK747MGRR, respectivamente). En  $D_6$  la amplitud del DK747MG fue mayor a la del DK747RR ( $P < 0.0001$ ) y a la del DK747MGRR ( $P = 0.006$ ). En  $D_{12}$  no se detectaron diferencias entre las curvas ajustadas.

Figura 3.3. Distribución de frecuencias de las rindes para los híbridos del grupo DK747 (a) y DK190 (b) en D<sub>6</sub> y D<sub>12</sub>. Los puntos representan la distribución de frecuencias de la población total y las líneas los ajustes a una curva gaussiana. Las barras grises representan la distribución de frecuencias de las plantas dominadas, y las barras blancas, la de las plantas dominantes del stand.

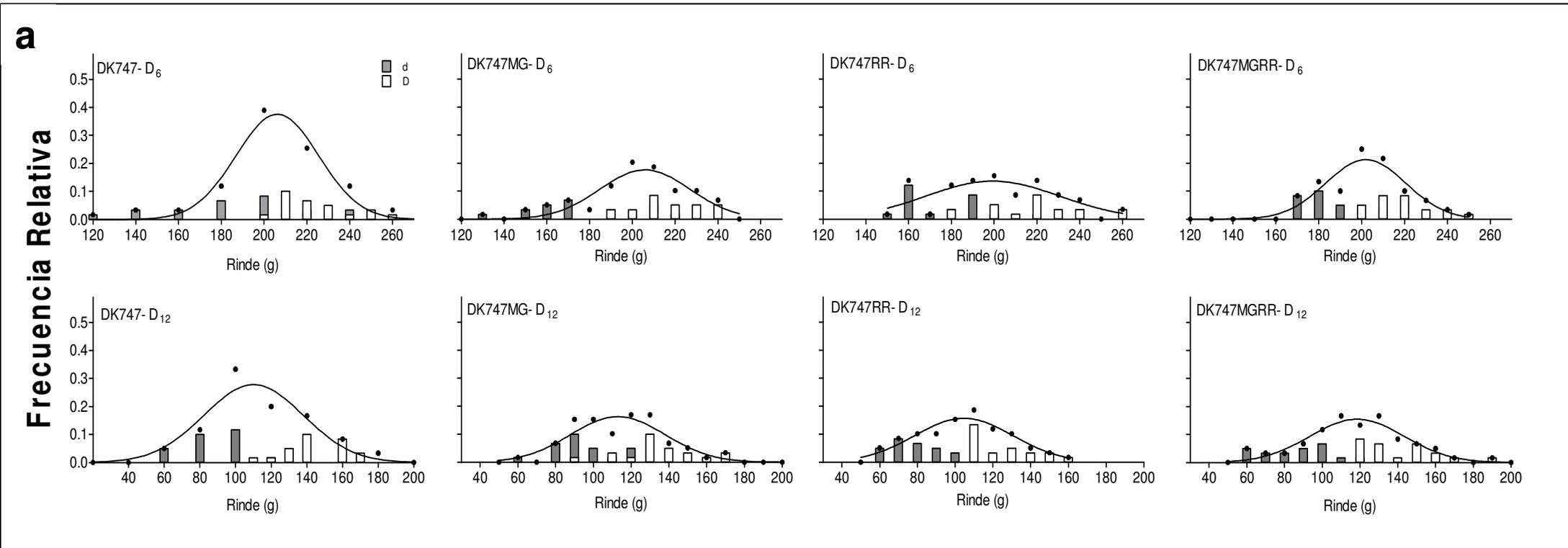
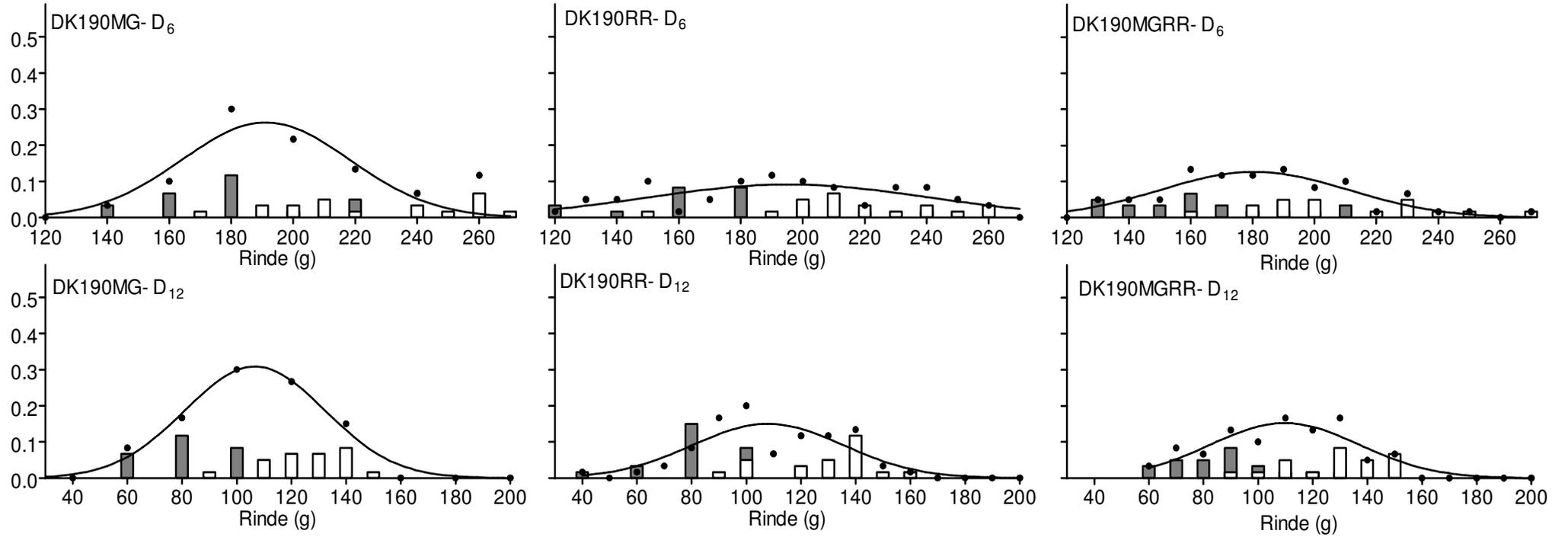


Fig.3.3. (continuación)

**b**

**Frecuencia Relativa**



La distribución de frecuencias del NGP del DK747MG en  $D_{12}$  ( $P= 0.29$ ) y del DK747RR en ambos tratamientos de densidad ( $P= 0.84$  y  $0.42$  para  $D_6$  y  $D_{12}$ , respectivamente, Tabla 6.1.) resultaron normales. Por el contrario, el DK747, el DK747MG y el DK747MGRR en  $D_6$  exhibieron distribuciones leptocúrticas ( $g_2= 4.92$ ,  $3.02$  y  $2.19$  para el DK747, el DK747MG y el DK747MGRR, respectivamente) con una fuerte asimetría positiva en el DK747 ( $g_1= 1.36$ ), mientras que en  $D_{12}$  el DK747 y el DK747MGRR presentaron distribuciones asimétricas negativas ( $g_1= -0.83$  y  $-1.02$  para el DK747 y para el DK747MGRR, respectivamente) y leptocúrticas ( $g_2= 1.51$  y  $1.04$  para el DK747 y para el DK747MGRR, respectivamente). En  $D_6$  la amplitud del DK747MG fue mayor a la del DK747RR ( $P<0.0001$ ) y a la del DK747MGRR ( $P= 0.006$ ). En  $D_{12}$  no se detectaron diferencias entre las curvas ajustadas.

El peso de los granos mostró desvíos de la normalidad para el DK747MG en  $D_6$  ( $P= 0.02$ , Tabla 3.2) y para el DK747MGRR en  $D_{12}$  ( $P= 0.06$ , Tabla 3.2). La DK747MG presentó una distribución asimétrica negativa en  $D_6$  ( $g_1= -0.59$ ) y el DK747MGRR en  $D_{12}$ , una distribución asimétrica positiva y leptocúrtica ( $g_1= 0.71$  y  $g_2= 0.97$ , Tabla 6.1.).

Para el grupo DK190, no se detectaron diferencias entre las versiones en las curvas ajustadas a la distribución de los datos del NGP y del peso de los granos en ninguna de las densidades estudiadas. Así, las distribuciones de ambos rasgos en general fueron normales con la excepción del NGP y peso de los granos del DK190MG en  $D_6$  ( $P= 0.01$  para NGP y  $P= 0.01$  para peso de granos, Tabla 3.2), y del NGP del DK190RR en  $D_{12}$  ( $P= 0.01$ , Tabla 3.2). El DK190MG en  $D_6$  y el DK90RR en  $D_{12}$  presentaron una distribución platicúrtica para el NGP ( $g_2= -1.07$  y  $-1.20$  para el DK190MG y el DK190RR, respectivamente, Tabla 3.2). El DK190MG en  $D_6$  presentó para el peso del

grano una distribución leptocúrtica y asimétrica negativa ( $g_1 = -0.64$  y  $g_2 = 1.80$ , Tabla 3.2).

### **3.4. Discusión**

En el capítulo anterior se identificaron diferencias en diversos rasgos del crecimiento y desarrollo entre las distintas versiones de dos híbridos de maíz. En este capítulo se describe la variabilidad fenotípica de estos rasgos en cada uno de los híbridos analizados. No se encontraron evidencias de que la introducción de transgenes incremente la variabilidad fenotípica de una población (i.e. híbridos transgénicos con mayor variabilidad que su versión convencional, o híbridos con dos eventos apilados con mayor variabilidad que la versión con un solo evento), pero sí se identificaron diferencias en la variabilidad fenotípica entre los híbridos de un mismo grupo especialmente en su respuesta al incremento de la presión de competencia por luz. Así, por ejemplo, entre los híbridos del grupo DK747, el DK747MGRR y el DK747MG presentaron una respuesta diferencial del CV de la  $TCE_{PC}$  y del rinde respectivamente, ante cambios en los valores medios de estos rasgos. Por el contrario los híbridos transgénicos del grupo DK190 presentaron un similar patrón de respuesta de los CV a la presión de competencia por luz.

Estos resultados son las primeras evidencias documentadas de diferencias fenotípicas en el crecimiento de la espiga alrededor de floración y en el rinde entre versiones de un mismo híbrido, ya que en estudios previos se documentaron diferencias genéticas en la  $TCE_{PC}$  al comparar líneas (Echarte y Tollenaar, 2006) o híbridos convencionales de maíz (Mayer et al., 2012).

En este estudio, el incremento de la densidad de siembra provocó un aumento de los CVs de diversos rasgos, incluso desde etapas tempranas del

desarrollo, tal como fue previamente documentado (Edmeades y Daynard, 1979b; Vega y Sadras, 2003; Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007). Sin embargo, algunas de estas respuestas parecerían estar inducidas por el ambiente, mientras que otras respuestas serían constitutivas de los genotipos. Así, dentro del grupo DK747, el mayor CV de la  $TCP_V$  lo presentó el DK747 en el Exp 1 y el DK747MGRR en el Exp 2. Similarmente, el mayor CV de la  $TCE_{PC}$  o del NGP lo presentaron en ambos experimentos el DK747MG y el DK747 respectivamente, pero sólo en alta densidad de siembra (i.e. respuestas inducidas por el ambiente). Por el contrario, en el grupo del DK190, la versión DK190MG presentó en todos los ambientes, experimentos y densidades analizadas (i.e. respuesta constitutiva), el mayor CV de la  $BE.BT^{-1}$ .

Independientemente del tipo de respuesta, la capacidad de las plantas en adquirir recursos del ambiente es un rasgo dinámico fuertemente dependiente del momento del ciclo en el cual ocurre el cambio en la disponibilidad de los recursos (Kira et al., 1953; Koyama y Kira, 1956). Bajo este marco conceptual, el incremento de la variabilidad poblacional del crecimiento es un indicador de las diferencias de los individuos en sus habilidades competitivas por la captura de recursos escasos (Edmeades y Daynard, 1979b; Weiner, 1986). Así, a lo largo del ciclo del cultivo son esperables incrementos en los CVs de los rasgos de crecimiento en ambientes más restrictivos, e.g. altas densidades de siembra (Maddonni y Otegui, 2004; Pagano y Maddonni, 2007) o una atenuación de la variabilidad inicial ante incrementos en la oferta de los recursos, e.g. raleos tardíos (Pagano y Maddonni, 2007) o fertilización N post-emergencia (Rossini et al., 2011). En este trabajo, se procuró reducir el estrés por N con la fertilización aplicada en  $V_6$ , y el estrés hídrico a través del riego complementario, con los cual el principal recurso limitantes para el crecimiento

de las plantas sería la oferta de radiación. Tal como era de esperar, la variabilidad inicial del crecimiento (CV de las  $TCP_V$ ) se fue reduciendo a lo largo del ciclo (i.e. menores CVs de la  $TCP_{RT}$  y  $TCP_{PC}$ ) en todos los genotipos en la densidad de siembra más baja. Por el contrario, para la mayor densidad de siembra, se detectaron distintos patrones temporales del CV: (i) las tres versiones del DK190 y el DK747RR tendieron a disminuir su CV a lo largo del ciclo, (ii) el DK747MG mantuvo estables sus CVs y (iii) el DK747 y el DK747MGRR exhibieron una disminución de la variabilidad inicial durante el período reproductivo temprano y un incremento hacia el período crítico. Estas diferencias genotípicas en la variabilidad poblacional en ambientes con estrés por luz contrastante, estaría sugiriendo una distinta plasticidad de las plantas en los mecanismos involucrados para evitar el sombreo mutuo (i.e. síndrome de evasión de sombra, Smith y Whitelam, 1997). Tal como ocurre en cualquier cubierta vegetal, la luz al atravesar los distintos estratos foliares no sólo cambia en su intensidad con la que llega a las plantas (i.e. menor densidad de flujo de fotones fotosintéticos) sino también en su calidad (i.e. disminuye la relación entre el rojo y el rojo lejano; R: RL). Ante este último estímulo lumínico, que puede preceder a la reducción de la intensidad de la luz (Ballaré y Casal, 2000), las plantas de maíz responden alterando la distribución espacial de las hojas de manera tal de reducir la interferencia entre las hojas de una misma planta, y entre las hojas de plantas vecinas (McLachlan et al. 1993; Maddonni et al., 2002). Aquellos genotipos (todas las versiones del DK190 y el DK747RR) que sostuvieron una reducción temporal del CV de crecimiento aún en alta densidad de siembra, poseerían una mayor plasticidad arquitectural para reducir la interferencia entre plantas vecinas logrando colonizar nichos con similar oferta de recursos dentro del canopeo (i.e. menor jerarquización de

plantas). Por el contrario, las plantas del DK747 y el DK747MGRR con incrementos del CV hacia las etapas reproductivas tardías, se comportarían como más rígidas en su plasticidad arquitectural. Existen diferencias genotípicas en el grado de plasticidad arquitectural entre híbridos de maíz (Maddonni et al., 2002), sin embargo hasta la fecha no ha sido documentado entre versiones de un mismo híbrido y debería ser testeado para corroborar esta hipótesis y posteriormente asociarlo a los efectos de la introducción de genes.

Un estudio más profundo de la variabilidad fenotípica que aquel basado en la cuantificación de los CVs de los diversos rasgos, es el enfoque poblacional (Vega y Sadras, 2003). Dentro del grupo DK747 y para el rasgo  $TCP_{PC}$  en ambas densidades de siembra, el DK747 presentó una distribución distinta de la normal con asimetría ligeramente positiva mientras que el DK747RR y DK747MGRR presentaron distribuciones normales. Este comportamiento constitutivo de la variabilidad fenotípica, parecería estar más asociado a la introducción del transgén de resistencia al herbicida que al de tolerancia al lepidóptero, ya que la distribución poblacional de las  $TCP_{PC}$  del DK747MG pasó de una fuerte concentración de datos alrededor del valor medio y leve asimetría negativa en baja densidad a una distribución normal en alta densidad (i.e. respuesta inducida por el ambiente). Curiosamente todas las versiones transgénicas del DK747 evidenciaron distribución normales de la  $TCP_{PC}$  en alta densidad de siembra, sugiriendo una menor jerarquización de plantas (i.e. plantas muy similares en sus  $TCP_{PC}$ ). Por el contrario, sólo el DK190MG presentó desvíos positivos de asimetría en la  $TCP_{PC}$  en esta densidad, indicando la presencia de un grupo pequeño de plantas con mayor habilidad competitiva que la mayoría de las plantas de la población (i.e. plantas

dominantes). Es discutido el rol de la jerarquización de plantas sobre el rendimiento final de un cultivo. Las diferentes habilidades competitivas entre las plantas de una población pueden llevar al desarrollo de jerarquías, con la coexistencia de individuos con alta y con baja capacidad en la captura de recursos (i.e. plantas dominantes y dominadas, respectivamente). Estos últimos, pueden llegar al extremo de auto-ralearse liberando recursos a las otras plantas y asegurando una mayor plasticidad del rendimiento del cultivo (e.g. estabilización del rendimiento en un rango amplio de densidades de siembra o ambientes). Este enfoque ecológico, sustentado en especies como la soja o el trigo, con mayor capacidad de compensación que el maíz, debido en las primeras a su relación lineal entre el crecimiento vegetativo y reproductivo (Andrade y Abatte, 2005), se contrapone con la del ideotipo de “plantas comunales” de Donald (1981). Bajo este enfoque, los cultivos con relaciones no lineales entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo como el maíz, alcanzan los mayores rendimientos del cultivo con plantas de similares  $TCP_{PC}$  que aseguran mantener estable la partición hacia estructuras reproductivas ( $TCE_{PC} TCP_{PC}^{-1}$ ) y la fijación de granos por unidad de  $TCE_{PC}$  (i.e. ER).

En ambos grupos de híbridos, las versiones MGRR exhibieron relaciones no lineales entre la  $TCE_{PC}$  y la  $TCP_{PC}$  (Fig. 2.1b, e) indicando fuertes caídas en la partición de biomasa hacia las espigas en las plantas con menores  $TCE_{PC}$  (i.e. plantas más suprimidas del *stand* en alta densidad de siembra). Si bien este efecto no se reflejó en los valores de asimetrías de las  $TCE_{PC}$  en alta densidad (Tabla 3.2) sí se manifestó claramente con una mayor separación en las  $TCE_{PC}$  entre los tipos extremos de plantas (dominantes y dominadas) (Fig. 3.2). Más aún, el DK747MGRR con mayor amplitud en las  $TCE_{PC}$  presentó una asimetría positiva de la distribución de frecuencias del TT a *silking*, indicando el atraso de

un grupo importante de plantas en alcanzar dicho estado y aumentando el valor promedio del TT a floración (Borrás et. al., 2007). En trabajos previos se ha demostrado a nivel de planta individual la relación negativa entre el NGP y la asincronía entre ambas floraciones motivada por el atraso en la floración femenina y su impacto sobre la ER (Rossini et al., 2012). Como consecuencia, si bien el DK747MGRR presentó la menor dispersión de ER en ambas densidades de siembra, presentó el mayor alejamiento de la ER potencial (Fig. 2.1c.) en alta densidad, reflejándose en una fuerte asimetría negativa del NGP dada por las plantas más suprimidas del *stand* con fallas en la fijación de granos. Por el contrario, el DK747MG con una relación más lineal entre la  $TCE_{PC}$  y la  $TCP_{PC}$  y una mayor estabilidad en las ER, presentó menores CV del NGP y del rinde sugiriendo una mayor tolerancia del DK747MG en condiciones de estrés por un aumento en la densidad de plantas.

Independientemente de estas diferencias genotípicas en las distribuciones poblacionales de las variables de crecimiento y desarrollo, las distribuciones de los rendimientos de todas las versiones del DK747 en  $D_{12}$  resultaron normales. La posibilidad de observar bi-modalidad en las distribuciones de frecuencia del rendimiento por planta en maíz está asociada a la presencia de plantas estériles (Daynard y Muldoon, 1983). En los experimentos de esta tesis, sólo se observó esterilidad durante el Exp 3 donde la presión de competencia en alguna de las hileras fue mayor que en las parcelas de los Exp 1 y Exp 2. No obstante se puede destacar que en la mayor densidad de siembra de los primeros experimentos (ca.  $120.000 \text{ pl.ha}^{-1}$ ) la versión convencional presentó mayor amplitud de las curvas de distribución del rendimiento que las restantes versiones, en contraposición con la hipótesis planteada (Fig. 3.3a). En el otro grupo de híbridos las distribuciones resultaron normales para el DK190RR y

DK190MGRR, pero no para la versión 190MG, la cual presentó asimetría negativa y curtosis positiva (Fig. 3.3. b). Este tipo de asimetría ha sido descrito por Daynard y Muldoon (1983), pero para el rendimiento de una población de plantas en baja densidad ( $62000 \text{ pl.ha}^{-1}$ ). Estos resultados en conjunto indican la mejora en la tolerancia a las altas densidades de siembra en híbridos modernos de maíz (Tollenaar y Wu, 1999).

### **3.5. Conclusiones**

No se encontraron evidencias de que la introducción de transgenes aumente la variabilidad fenotípica de la población, de hecho, algunos de los caracteres mostraron lo contrario a lo hipotetizado. Por ejemplo, el DK747MGRR en  $D_6$  presentó una distribución poblacional menos variable que la versión convencional para las  $TCE_{PC}$  y las ER. Sin embargo, esa misma versión, a muy alta presión de competencia, aumentó rápidamente el CV respecto a las otras versiones, por lo que se concluye que el DK747MGRR sería menos tolerante al incremento de la densidad de siembra. Por otro lado, la versión DK747MG presentó menores CV en  $D_{12}$  para varios caracteres (e.g. BT,  $TCP_{PC}$ , NGP), y más aún, frente a muy altas densidades de siembra mantuvo los CV del rinde más bajos que los de las otras versiones, un síntoma de su tolerancia a la densidad. Las versiones transgénicas del grupo DK190 no difirieron en su respuesta del CV a la disminución del valor medio del rasgo. Tal como se discutió en el capítulo anterior los dos grupos de híbridos no respondieron de manera similar al ambiente según la presencia de los transgenes, sugiriendo que la introducción del transgén en sí misma no es la responsable de las diferencias fenotípicas halladas entre las distintas versiones. Posiblemente la interacción del transgén con el fondo genético esté

gobernando estas respuestas. Restan estudiar las posibles causas genéticas de la variabilidad observada.

## **CAPÍTULO 4**

**Estudio de la variabilidad genética  
dentro y entre híbridos convencionales  
y transgénicos de maíz (*Zea mays* L.)**

#### 4.1. Introducción

La producción mundial de maíz se ha incrementado notablemente en estos últimos 50 años (<http://faostat.fao.org>), y el mejoramiento genético es responsable en una gran proporción de ese aumento. En principio el mejoramiento de maíz se basó en la explotación de la heterosis conjuntamente con la selección de líneas endocriadas, generándose híbridos dobles, triples y simples con los que se logró incrementos sostenidos de los rendimientos (Rossi, 2007). Posteriormente, la incorporación de eventos transgénicos contribuyó a la incorporación de resistencia y/o tolerancia a herbicidas y lepidópteros, entre otros (Rossi, 2007).

El progreso en el uso de la biotecnología para el mejoramiento de especies cultivadas (cereales, oleaginosas, plantas cultivadas para uso de la industria textil) se ha concentrado en intentar reducir la incidencia de estreses bióticos (plagas y malezas) o facilitar su control. En 1986 la empresa Monsanto logró obtener la primera planta genéticamente modificada. En 1994 se aprobó la comercialización del primer alimento transgénico, y su comercialización se efectivizó en 1996. Hacia el año 2003 en Estados Unidos ya el 38% del maíz sembrado correspondía a maíces transgénicos (Scott y Pollak, 2005). Actualmente los cultivos transgénicos de soja, maíz, algodón, canola y otros ocupan un gran porcentaje de la superficie sembrada (<http://faostat.fao.org>). Respecto a la comercialización en Argentina, los primeros maíces transgénicos -Bt llegaron hacia el año 1998 (Flores y Parodi, 2011), y desde su introducción al mercado han sido ampliamente aceptados.

Los maíces transgénicos difundidos son los híbridos -Bt (llamados comercialmente MG) y los RR. Los primeros presentan tolerancia a

lepidópteros, mientras que los segundos tolerancia a la aplicación de glifosato (Roundup Ready).

Actualmente los híbridos transgénicos de maíz Bt y RR o el doble transgénico –Bt+RR son comercializados en muchos países, y se estima que la adopción de organismos genéticamente modificados va a seguir aumentando en los próximos años. Esto se debe a que en la producción de maíz con estos híbridos, disminuyen los costos ya sea por ahorro en el uso de diferentes herbicidas o por una reducción en la aplicación de insecticidas.

El evento -Bt de maíz (MON810, Levine, 2004) consiste en el gen de la proteína *Cry1Ab* bajo la regulación del promotor 35S del virus mosaico de coliflor, y produce una versión trunca de la proteína *Cry1Ab* de los insectos, aumentando así la resistencia frente a lepidópteros.

El glifosato es un herbicida que inhibe la acción de la enzima CP4- EPSPS, clave en la síntesis de compuestos aromáticos como los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Amrhein et al., 1980; Mousedale y Coggins, 1984; Wang et al., 1991). El evento -RR de maíz NK603 (Behr et al., 2004) lleva el gen de la proteína 5- enolpiruvilshikimato-3- fosfato (CP4- EPSPS) de *Agrobacterium thumefaciens*. Este gen es el que confiere la tolerancia al glifosato.

La variabilidad fenotípica observada entre las diferentes versiones del grupo de híbridos del DK747 y DK190 (capítulos previos) podría deberse a variabilidad en la respuesta frente al ambiente, variabilidad genética, o la interacción entre ambos factores. En híbridos transgénicos, la incorporación de los eventos se realiza mediante la cruce de una línea fuente del transgén y sucesivas retrocruzas con la línea original. El arrastre por ligamiento de los alelos del padre donante, podría hacer que éstos permanecieran en el genotipo

recurrente incrementando la probabilidad de tener loci heterocigotas en la línea modificada (Tanksley y Nelson, 1996). Por lo tanto, el modo de obtención de un híbrido transgénico podría aportar variabilidad genética manifiesta en diversos caracteres fenotípicos en condiciones de cultivo. Una de las maneras de medir variabilidad genética es mediante el uso de marcadores moleculares. Los microsatélites (Simple Sequence Repeats, SSRs) son repeticiones de secuencias cortas (2-6 pb) en tándem, cuyas regiones flanqueantes son únicas, permitiendo utilizarlas como primers para amplificar la región de secuencias repetitivas. Dado que estas secuencias mutan a una alta tasa, el número de unidades de repetición puede variar de generación en generación y por lo tanto los productos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) varían en tamaño. Además, los microsatélites tienen la ventaja de ser marcadores co-dominantes, distribuidos en todo el genoma y neutros, es decir que no se encuentran sujetos a presiones de selección. Todas las características anteriormente mencionadas hacen que este tipo de marcadores resulte útil tanto para observar variabilidad entre poblaciones naturales como entre líneas de maíz (Lia et al., 2009). Otro tipo de marcadores moleculares utilizados para describir variabilidad son los SNP. Si bien éstos presentan una tasa de mutación menor a la de los SSRs, tienen la ventaja de determinar diferencias entre un alelo y otro debido a un cambio de una base nitrogenada por otra y no por variaciones en el tamaño de un fragmento (Rafalski, 2002). Una ventaja importante de estos marcadores es que su detección puede automatizarse, con lo que es posible realizar el análisis de miles de SNPs (ca. 50.000) determinados, permitiendo conocer la variación alélica de numerosos marcadores al mismo tiempo.

Los objetivos de este capítulo fueron: (i) establecer si existen diferencias genéticas entre híbridos simples de maíz en su versión convencional y en las distintas versiones transgénicas para el grupo de híbridos DK747, así como también entre las diferentes versiones transgénicas del DK190; (ii) establecer si existen diferencias genéticas entre plantas de una misma versión; (iii) asociar la variabilidad genética a la introducción de los transgenes; (iv) asociar la variabilidad genética a la variabilidad fenotípica observada en los capítulos anteriores.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Extracciones de ADN y conformación de bulks**

La variabilidad genética entre las versiones de un mismo grupo de híbridos se midió mediante el uso de microsatélites. Se recolectó tejido foliar proveniente de una porción de la hoja inmediatamente inferior a la de la espiga de cada una de las plantas marcadas de los Exp 1 y Exp 2. Las muestras se almacenaron al momento de ser cosechadas en freezer de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser liofilizadas. Las extracciones de ADN se realizaron a partir del tejido liofilizado según protocolo basado en Shagai-Marooft et al. (1984), a base de CTAB (Tris 100 mM, NaCl 700 mM, EDTA 50mM, CTAB, SDS 1%). Una vez extraído, el ADN fue cuantificado en geles de agarosa comparando con muestras patrón, luego fue diluido y utilizado para conformar bulks (10 nM) o para las reacciones de PCR directamente. Los bulks para cada versión de ambos híbridos fueron conformados por ADN de seis plantas, las cuales se eligieron por ser variables en sus BT (3 plantas de los extremos de las campanas de distribución de frecuencias, considerando los experimentos 1 y 2).

#### **4.2.2. Condiciones de PCR**

Se utilizó para todos los microsatélites, el protocolo de PCR “touchdown” (Don et al., 1991). El mismo incluye una sucesión de 10 ciclos que van disminuyendo la temperatura de hibridación de los primers 1°C en cada ciclo (desde 65°C hasta 55°C) y posteriormente una sucesión de 30 ciclos a temperatura de hibridación constante (60°C). Cada ciclo constó de una desnaturalización inicial (30 segundos a 94°C), una hibridación de los primers (30 segundos a la temperatura correspondiente según lo explicado anteriormente) y una extensión (30 segundos a 72°C). Para finalizar, el programa también se incluyó una extensión final de 10 minutos. La mezcla de reacción constó de ADN templado (2,5 ug ml<sup>-1</sup>), Cl<sub>2</sub>Mg (1,54 mM), solución buffer (ClK 50mM, Tris HCl 10mM pH 9 a 25°C y Tritón X-100 0,1%), Taq polimerasa 0,5U, dNTPs 0,05 mM de cada tipo y primers 0,35 mM de cada uno (forward y reverse), en un volumen final de 12ul por cada reacción.

#### **4.2.3. Visualización de los resultados**

Para observar el producto de PCR amplificado se procedió a la realización de geles de urea-poliacrilamida (6%) para la separación de los alelos por electroforesis a través de una solución buffer TBE (Tris- Borato 0,09M, EDTA 0,002M, pH 8,3) y posterior revelado con nitrato de plata para su visualización. Esta técnica de revelado, debido a su poder resolutivo, aumenta las probabilidades de ver bandas de baja intensidad, que con otros métodos no podrían ser resueltas. Previamente a la siembra de los productos de PCR en los geles, éstos fueron mezclados con la solución buffer de siembra (formamida 95%, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05% y NaOH 10mM). La mezcla de los geles incluyó acrilamida (6%), bisacrilamida (0,3%), urea (42%), TBE

10X (5%), TEMED (0,047%) y persulfato de amonio (0,47%). El revelado constó de cuatro pasos: fijación en solución de ácido acético (10%) durante 20 minutos en agitación, lavado con agua bi-destilada (3 lavados en agitación, 2 minutos cada vez), tinción con nitrato de plata (0,1%), 30 a 40 minutos en agitación y revelado con carbonato de sodio (3%) el tiempo necesario para la visualización de los productos de PCR en el gel.

#### **4.2.4. Elección de los microsatélites**

Los microsatélites de maíz utilizados fueron *bnlg* (Brookhaven National Laboratory of Genetics), *nc* (North Carolina), *phi* (Pioneer high bred) y *umc* (University of Missouri, Columbia). En principio se estudiaron aquellos marcadores que se conoce que son nítidos al ser revelados y polimórficos en otras líneas y poblaciones estudiadas (Deluchi, comunicación personal), intentando abarcar diferentes cromosomas y regiones genómicas. El hecho de no conocer las líneas parentales de los híbridos DK747 y DK190 no permitió hacer inferencias sobre los tamaños de banda esperados según cada microsatélite. Esto, de alguna manera, complicó el análisis de algunos de los marcadores SSR, dado que existe la posibilidad de que algunas de las llamadas “sombras” se confundieran con una banda real y viceversa. Los primeros microsatélites estudiados fueron phi113 (bin 5.03), phi083 (bin 2.04.), umc1380 (bin 10.0), phi080 (bin 8.08), phi075 (bin 6.00), bnlg1839 (bin 10.07), umc1887 (bin 6.03), umc1752 (bin 5.06), nc004 (bin 4.03), phi96100 (bin 2.01) y bnlg420 (bin 3.05).

Luego del estudio realizado con microsatélites elegidos al azar y distribuidos a lo largo de todo el genoma, se decidió estudiar la variabilidad genética mediante el uso de marcadores microsatélites cercanos a la inserción de los

eventos MON810 y NK603. La información de los eventos utilizados en estos híbridos fue provista por la empresa. Para ello primero se debieron localizar los sitios de inserción de ambos eventos.

#### **4.2.5. Localización de los eventos MON810 y NK603 en los híbridos DK747 y DK190**

Se tomaron como referencia las secuencias publicadas en las respectivas patentes (Behr et al., 2004; Levine, 2004) y además se realizó una búsqueda de trabajos relacionados a las regiones flanqueantes de la inserción de estos eventos en maíz, encontrándose dos trabajos que aportaron información sobre las secuencias flanqueantes del MON810 (Holck et al., 2002; Hernández et al., 2003). Éstas se alinearon con las secuencias de las patentes utilizando el programa MultAlin (Corpet, 1988). Con las secuencias obtenidas en dicho alineamiento se realizó una búsqueda en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) que permitió ubicar las secuencias en el genoma de maíz. Luego, se diseñaron primers específicos para esas regiones utilizando el programa *PRIMER3* (Rozen y Skaletsky, 2000), con el objetivo de confirmar la localización en los híbridos utilizados en este trabajo. Los primers fueron diseñados de manera tal que hibridara uno con la secuencia del transgén y otro con la secuencia endógena de maíz, basándose en la teoría para localizar genes mutados por inserciones de T-DNA en *Arabidopsis* (Krysan et al., 1999). Además, en el caso del MON810, se utilizaron pares de primers publicados en las patentes.

Se probaron cinco pares de primers, con condiciones de PCR estándar (vol. final 20ul, 3ul ADN templado, 0,16ul de cada primer, 2ul de buffer 10X, 0,6ul de Mg<sup>2+</sup>, 0,6ul dNTPs, 0,24ul Taq polimerasa y 39 ciclos) y en condiciones

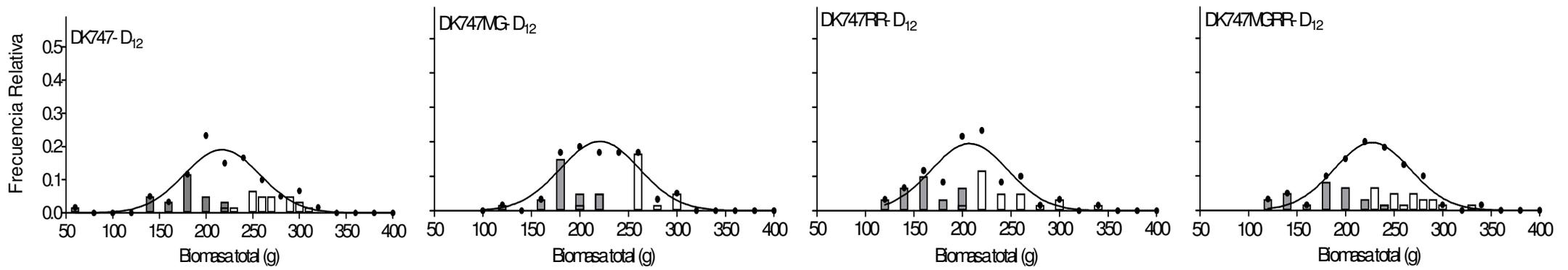
estándar modificadas (con agregado de betaina, o DMSO), adaptando el programa de PCR según las temperaturas de hibridación óptimas de los primers y según la extensión del producto esperado. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio.

#### **4.2.6. Estudio de marcadores SNP**

Dado que las plantas presentaban alta similitud genética entre ellas, resultó necesario aumentar el número de marcadores moleculares para poder observar la variabilidad. Es por eso que se procedió al estudio del patrón de SNP.

Se realizaron nuevas extracciones de ADN tal como se explicó en 4.2.1. con el fin de estudiar el patrón de marcadores SNP. Dado que para el grupo de híbridos del DK747 se contaba con las cuatro versiones (convencional, -Bt, -RR, -Bt RR), y que en este grupo se habían observado las mayores diferencias fenotípicas entre las versiones (cap. 2 y 3), para este análisis se consideraron 12 plantas de cada una de las versiones del DK747, completando un total de 48 individuos. El grupo de 12 plantas de cada versión fue conformado por 4 plantas clasificadas como dominantes (i.e. del tercil superior de la distribución de las biomásas totales), 4 plantas dominadas (del tercil inferior) y 4 plantas del tercil medio, incluyendo ambos años de experimento (Fig. 4.1.).

Figura 4.1. Distribuciones de frecuencias de biomasa total en  $R_6$  de las poblaciones DK747, DK747MG, DK747RR y DK747MGRR en  $D_{12}$ . Los puntos representan las frecuencias relativas de la población total, las líneas representan la curva gaussiana ajustada; las barras grises, la distribución de las plantas dominadas y las barras blancas, la distribución de las plantas dominantes del stand.



Para el estudio de los SNP se utilizó el denominado MaizeSNP50 beadchip de Illumina, el cual contiene 56.110 marcadores seleccionados de bases de datos públicas y privadas, basados en la secuencia de la línea B73 y distribuidos a lo largo de todo el genoma (~2.3 Gpb). Debido a que el chip se basa en la secuencia de B73, un porcentaje de los SNP testeados no resultaron informativos, por lo que fueron excluidos de los análisis subsiguientes, obteniendo finalmente un número de 48722 SNP considerados en el análisis de variabilidad genética. Además, otros SNP no resultaron confiables según el valor de GC, el cual es un indicador de la precisión del dato que considera la reproductibilidad, la correlación entre hebras, la concordancia con otros métodos de genotipado y la consistencia con la herencia mendeliana (Fan et al., 2003). Cuando el GC es  $<0.15$ , los resultados no son confiables y por lo tanto deben excluirse del análisis. Así, se excluyeron 386 SNP.

Además se localizaron los SNP en el genoma de manera tal de poder asociar la variabilidad genética a la introducción de los transgenes o a la variabilidad fenotípica observada.

#### **4.2.7. Estimación de la variabilidad genética**

A través de las frecuencias genotípicas de la población total ( $N= 48$ ), se cuantificaron y seleccionaron los marcadores que no resultaron variables entre los individuos y los que sí lo hicieron. Entre los marcadores que mostraron frecuencias variables, se estudiaron las frecuencias genotípicas y alélicas dentro de cada sub-población de cada versión ( $n= 12$ ). El conjunto de frecuencias para cada uno de los marcadores, sumado a los SNP no variables entre las versiones, permitieron cuantificar la heterocigosis (Ec. 4.1), indicador

de la variabilidad de cada subpoblación (Hedrick, 2000) mediante la siguiente fórmula:

$$H = \frac{1}{N \cdot m} \cdot \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^m H_{ij} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde  $H$  es la heterocigosis,  $N$  es el número de individuos analizados,  $m$  es el número de SNP analizados,  $H_{ij}$  representa al individuo heterocigota  $i$  para un marcador  $j$ .

Entre los SNP que presentaron más de un alelo en la población de 48 individuos (i.e. todas las versiones), se cuantificaron los marcadores variables entre los individuos dentro de cada versión, con el fin de comparar la variabilidad genética, y se discriminaron los SNP que resultaron heterocigotas para todos los individuos de las subpoblaciones. Posteriormente se discriminó entre plantas dominantes y dominadas dentro de cada versión y nuevamente se cuantificaron los SNP variables en cada subpoblación. Esto se realizó con el objetivo de comparar patrones de marcadores entre los grupos extremos de plantas basándose en el análisis de bulks segregantes (Michelmore et.al., 1991). Por último, se cuantificaron los SNP variables entre las plantas de cada versión, discriminando los marcadores que resultaron variables sólo para alguna de las versiones, para dos o más versiones y los que presentaron variabilidad en todas las versiones.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Variabilidad genética a través del estudio de microsatélites**

De los microsatélites utilizados para explorar la variabilidad existente entre las versiones de los dos grupos de híbridos, los primeros nueve (phi113, phi083, umc1380, phi080, phi075, bnlg1839, umc1887, umc1752, nc004) se encontraron invariables entre las versiones, dentro de cada grupo (ej. Figura 4.2.). Cabe destacar que el umc1380 presentó diferencias entre ambos grupos de híbridos, pero no entre las versiones. El nc004 y el phi96100 no se lograron visualizar claramente, por lo que no se puede concluir acerca de la variabilidad en esos microsatélites. Por último, el bnlg420 no mostró ningún patrón de bandas visible con las técnicas utilizadas.

#### **4.3.2. Localización de los eventos transgénicos**

Para determinar la posición de ambos eventos transgénicos en el genoma de maíz se tomaron las secuencias publicadas en ambas patentes (Levine, 2004; Behr et al, 2004), las cuales corresponden a los extremos 5' y 3' de ambas inserciones y las regiones flanqueantes de ADN endógeno de maíz. Estas secuencias fueron alineadas con otras previamente publicadas (Holck et al., 2002; Hernández et al., 2003) y posteriormente, utilizando la herramienta BLAST con las bases de datos de [www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org); [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y [www.maizesequence.org](http://www.maizesequence.org), pudieron ser identificadas las secuencias correspondientes a los transgenes y las secuencias endógenas de maíz y consecuentemente la ubicación en el genoma.

Considerando independientes los alineamientos de cada extremo 5' y 3', se determinó para cada transgén la posición más probable. Para el MON810, con un valor E de  $4 \times 10^{-76}$ , se determinó como posición más probable la región del

BIN5.03 del cromosoma 5. Para el NK603, la posición más probable, con un valor E de  $5 \times 10^{-70}$ , fue la de la región correspondiente al BIN6.01 del cromosoma 6. En ambos casos se diseñaron primers para confirmar las posiciones de la inserción estimadas con el BLAST en los dos grupos de híbridos utilizados en este trabajo. Se probaron cinco pares de primers de los cuales se calculó el tamaño de banda esperado a partir de las secuencias (Tabla 4.1., Fig. 4.3.).

Figura 4.2. Productos de amplificación de algunos de los MSAT, visualizados en geles de poliacrilamida. En (a), (b) y (d): (1) bulk DK747, (2) bulk DK747MG , (3) bulk DK747RR, (4) bulk DK747MGRR, (5) bulk DK190MG, (6) bulk DK190RR, (7) bulk DK1907MGRR. En (c): (1) bulk DK747 A, (2) bulk DK747 B, (3) bulk DK747MG A, (4) bulk DK747MG B, (5) bulk DK747RR A, (6) bulk DK747RR B, (7) bulk DK747MGRR A, (8) bulk DK747MGRR B, (9) bulk 190MG A, (10) bulk 190MG B, (11) bulk 190RR A, (12) bulk 190RR B, (13) bulk 190MGRR A, (14) bulk 190MGRR B.

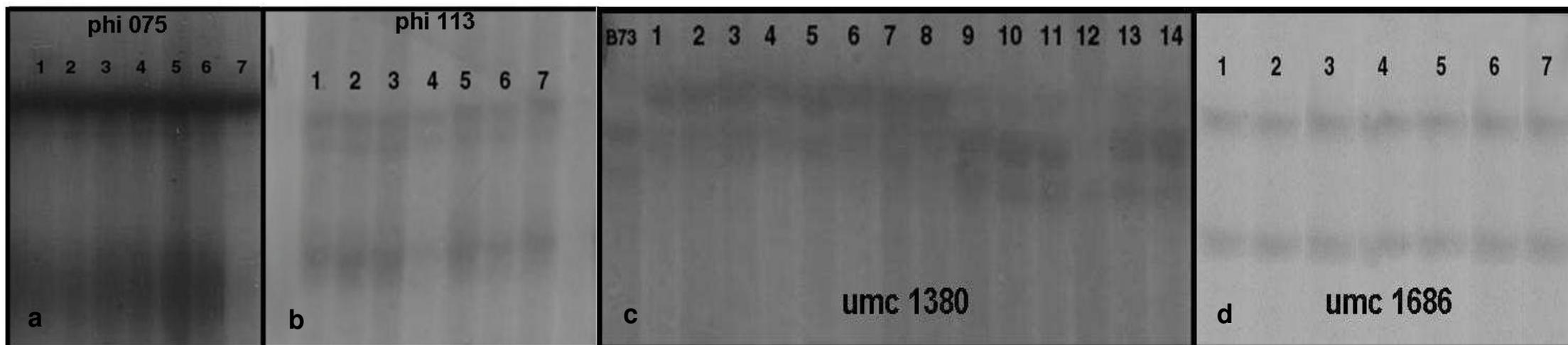
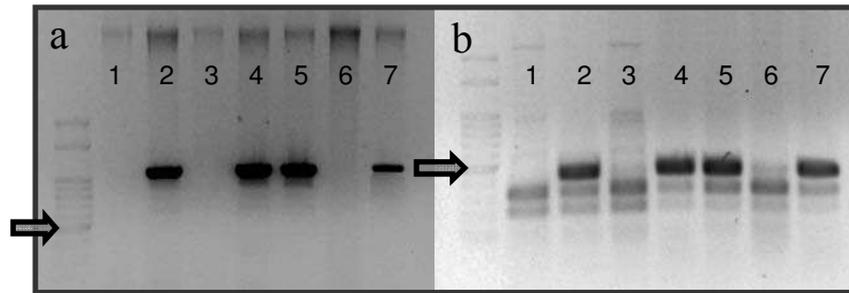


Tabla 4.1. Pares de primers utilizados para la localización del transgén MON810 en los híbridos del grupo DK747 y DK190.

<b>Forward</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Reverse</b>	<b>Secuencia</b>	Tamaño aproximado esperado
Mon7.8 forward	TCAAGCCGAAGGTACATC	Mon7.8 reverse	GCTAGAGTCAGCTTGTCAGCG	<b>566 pb en versión -Bt (*)</b>
Mon gen for	ATAACCTTCGCCCCGAAAATC	Mon ins rev	CAACGATGGCCTTTCCTTTA	<b>180 pb en versión -Bt</b>
Mon9.10 forward	TTCGACGAGTGCTACCCTACCTACTTG	Mon9.10 reverse	CCTTCATATCTGTTGCCCTTCTATTGA	<b>878 pb en versión -Bt (*)</b>
Mon ins for	CACAGCCACCACTTCTCCTT	Mon gen rev	CTGCTGCAGGTGGTCTTACA	<b>214 pb en versión -Bt</b>

(\*) Pares de primers tomados de la patente (Levine, 2004).

Figura 4.3. Resultados de la PCR para los pares de primers (a) Mon7.8 forward + reverse (extremo 5' de la inserción), (b) mon ins for + mon gen rev. (extremo 3' de la inserción). Se observan las bandas esperadas (aprox. 560 pb para el par Mon7.8, aprox. 220 para el par mon ins for + mon gen rev.) solo en las versiones que portan el transgén MON810 (-Bt). El marcador de peso molecular presenta las bandas cada 50 pb. y se señala con una flecha la banda correspondiente a 250 pb. El orden de las calles es DK747 (1), Dk747MG (2), DK747RR (3), DK747MGRR (4), DK190MG (5), DK190RR (6), DK190MGRR (7).



Dos de los pares de primers diseñados confirmaron la localización del transgén MON810 (versiones Bt), al observarse las bandas del tamaño esperado según las secuencias utilizadas para el diseño de los primers, solamente en las versiones portadoras del -Bt (Fig. 4.3.). Por lo tanto se concluyó que el evento MON810 se ubica en el cromosoma 5, BIN5.03, alrededor de la posición 66430525- 66442796 pb.

Para confirmar la localización del NK603 en los híbridos utilizados en este trabajo se diseñaron los pares de primers descritos en la tabla 4.2, figura 4.4.

De los cuatro pares de primers diseñados (Tabla 4.2.) para confirmar la localización en el BIN 6.03 tal como se determinó por BLAST, solamente el par NK5' F+R mostró producto de amplificación. Sin embargo este par de primers, no permitió dicha confirmación para el grupo DK190 ya que se detectó una banda del mismo tamaño en la versión -Bt. No obstante, sí se obtuvieron las bandas esperadas en las versiones -RR y -BtRR para el grupo DK747, aunque no en el tamaño esperado (Fig. 4.4.).

Tabla 4.2. Pares de primers utilizados para la localización del transgén NK603 en los híbridos del grupo DK747 y DK190.

<b>Forward</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Reverse</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño aproximado esperado</b>
Nk ins5' F	TTTCTCTGGCATTTC CAACC	Nkins5' R	TCCCGACTCTCTTCTCAAGC	<b>168 pb en versión -RR</b>
Nk ins3' For	CCGCTACCAGCACCTTTTAC	Nkgen rev	CCTCGAGTATTGGCTTGGAG	<b>221 pb en versión -RR</b>
Nk3a F	GACGTTATTTATGAGATGGGTT	Nk3a R	GAAAGGAAGGCGCGAGATGATG	<b>1183 pb en versión -RR</b>
Nk3b F	TTGCAAACCCACTGTACGAA	Nk3b R	CCTCGAGTATTGGCTTGGAG	<b>188 pb en versión -RR</b>

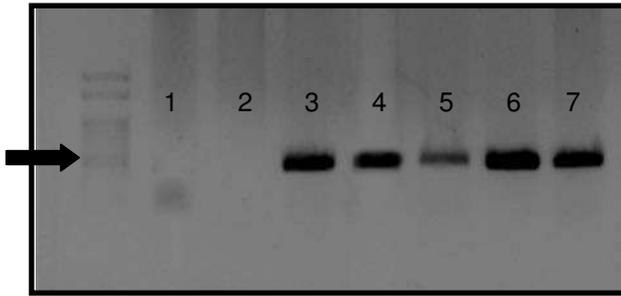
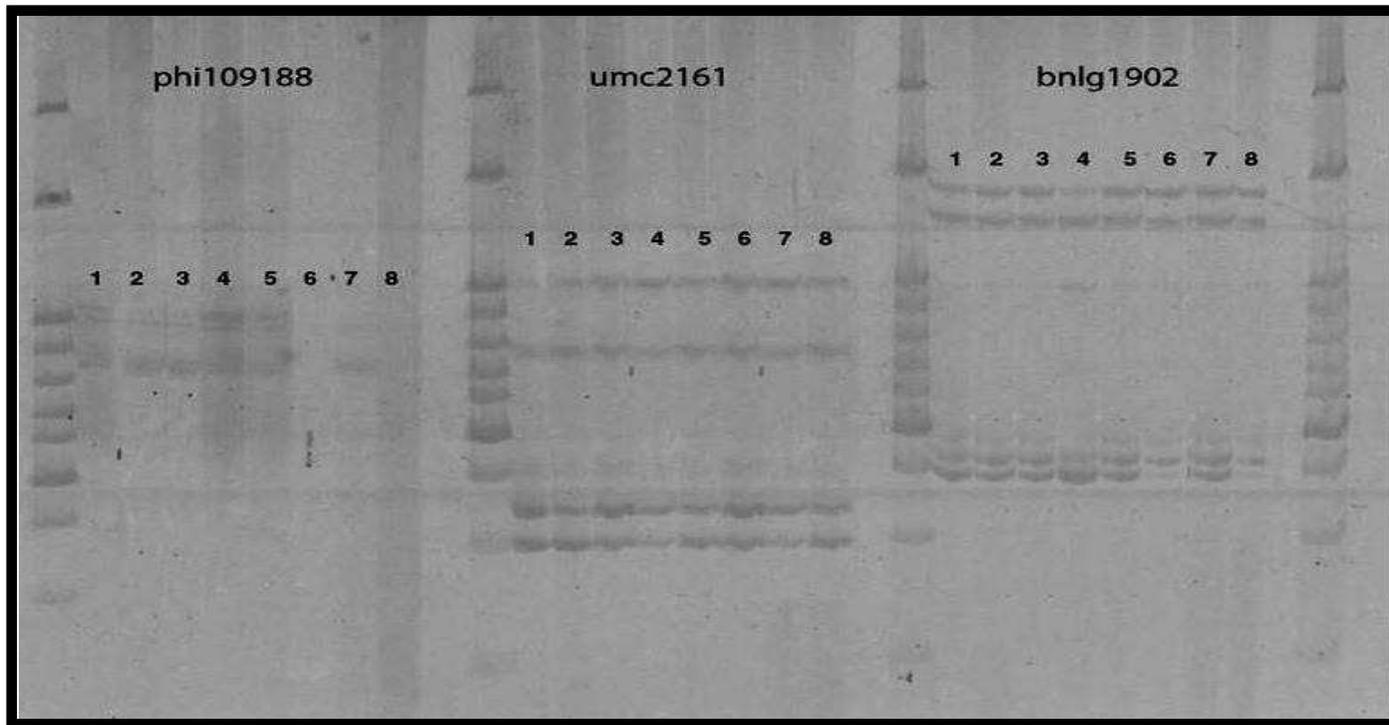


Figura 4.4. Resultados de la PCR para el par de primers NK5' F+R. Se observa la banda de ~240 pb. El marcador de peso molecular presenta las bandas cada 50 pb. y se señala con una flecha la banda correspondiente a 250 pb..El orden de las calles es DK747 (1), Dk747MG (2), DK747RR (3), DK747MGRR (4), DK190MG (5), DK190RR (6), DK190MGRR (7).

### 4.3.3. Variabilidad genética alrededor del inserto

Conociendo la localización del MON810 en el genoma, se estudió la variabilidad a través de microsatélites alrededor del transgén Bt (i.e. todos ubicados en el BIN5.03) sobre muestras de ADN de los híbridos del grupo DK747 (Bulks). Los marcadores estudiados fueron: phi113, umc2140, phi008, bnlg1879, umc1686, bnlg1700, umc1731, phi109188, umc2161 y bnlg1902. Estos microsatélites estudiados no se han encontrado variables entre las versiones del DK747 (ej. Fig.4.5).

Figura 4.5. Patrón de microsatélites cercanos a la inserción del transgén Bt. Se presentan los resultados para los bulks de las versiones del DK747. (1) bulk DK747 A, (2) bulk DK747MG A, (3) bulk DK747RR A, (4) bulk DK747MGRR A, (5) bulk DK747 B, (6) bulk DK747MG B, (7) bulk DK747RR B, (8) bulk DK747MGRR B.



#### **4.3.4. Patrón de SNP: comparación de la variabilidad entre plantas dentro de cada versión**

Como se explicó en la sección 4.2.6., del total de 56110 SNP del chip, se excluyeron 7338 por no dar reacción o por bajo valor de GC (<0.15), quedando un número total de 48722 SNP para analizar. Entre éstos, un 89.99% resultaron idénticos entre los 48 individuos analizados, mientras que el 10.01% resultaron variables (4493 SNP).

Se analizaron las frecuencias genotípicas y el número de marcadores variables entre individuos de una misma versión. Se determinó que la versión convencional presentó mayor número de SNP variables (3435) que las restantes versiones (2203, 2461, 1221, para las versiones, -Bt, -RR y -BtRR, respectivamente). (Fig. 4.6.a.). Esta variabilidad no está relacionada con la proporción de heterocigotas de las poblaciones ( $H= 0.495, 0.476, 0.502, 0.471$  para las versiones convencional, -Bt, -RR y -BtRR, respectivamente; Fig. 4.6.b).

Para determinar el grado de variabilidad entre los grupos de individuos dominantes y dominados del *stand* se realizó el mismo tipo de análisis. Entre los individuos del DK747 las plantas dominantes y del tercil medio presentaron mayor cantidad de SNP variables entre ellas que las plantas dominadas (2940 y 2945 para las plantas del tercil medio y dominantes, respectivamente, y 2186 para las plantas dominadas). Este patrón se repitió para el DK747MG. Sin embargo entre las plantas DK747RR, las del tercil medio fueron las que presentaron la menor variabilidad genética, mientras que entre las plantas del DK747MGRR, la proporción de SNP variables fue parecida para los tres grupos de plantas (Fig. 4.7.).

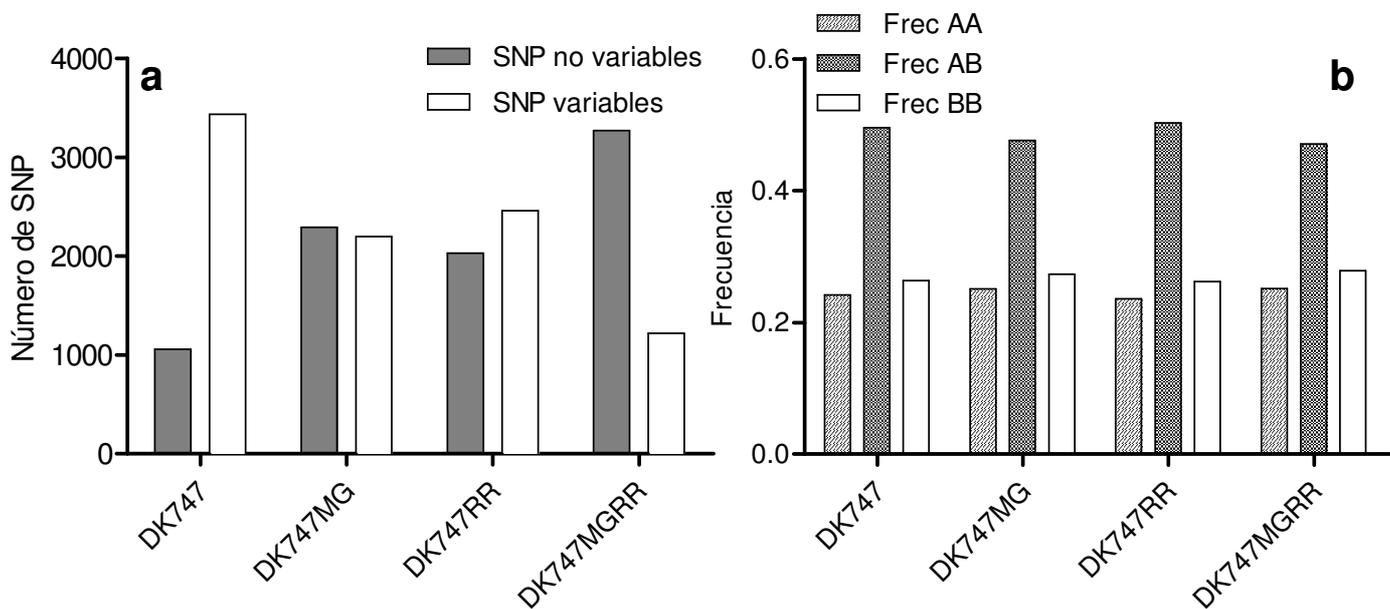
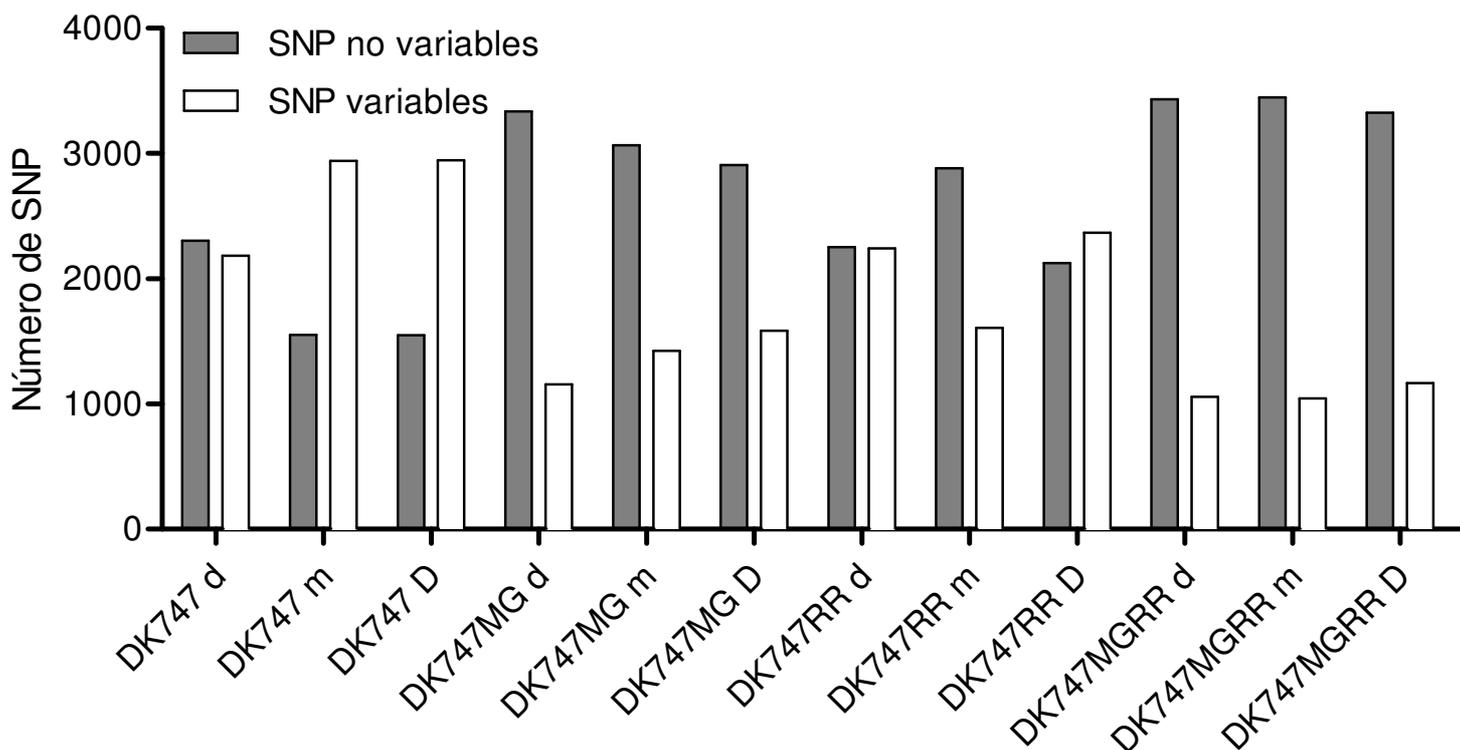


Figura 4.6. a. Número de SNP variables y no variables entre los individuos de las poblaciones de cada una de las versiones del DK747. Se consideraron los 4493 SNP que habían resultado variables en la población total de 48 individuos. b. Frecuencias genóticas de las poblaciones de cada versión (calculadas con el número total de SNP estudiados, 48336).

Figura 4.7. Número de SNP variables y no variables entre las plantas dominantes (D), medias (m) y dominadas (d) de las poblaciones dentro de cada versión del DK747. Se consideraron los 4493 SNP que habían resultado variables en la población total de 48 individuos.



**4.3.5. Patrones de SNP consistentes en grupos de plantas dominantes y dominadas.**

Como resultado del análisis de bulks segregantes se evidenció que solamente el DK747MG presentó patrones consistentes (i.e. todas las plantas dominantes presentaron un genotipo, y las dominadas, otro) de segregación para las plantas dominantes y dominadas del *stand*. Estos patrones consistentes se encontraron para 187 SNP, distribuidos en los cromosomas 3 (89.3%), 4 (0.53%), 5 (7.5%), 7 (1.07%) y 10 (0.53%), más un 1.07% cuya ubicación no ha podido ser establecida.

Para la mayoría de los SNP (184) se observó que las plantas clasificadas como dominadas eran heterocigotas, y las dominantes, homocigotas, o viceversa. Solamente para tres casos ubicados en el cromosoma 3 alrededor de la posición 102005294- 102545948 pb (BIN 3.04; PZE-103065531, PZE-103065533 y SYN594) ocurrió que tanto las plantas dominantes como las dominadas resultaron homocigotas pero portando diferentes alelos.

#### 4.3.6. Ubicación de los SNP variables

Se estudió la totalidad de los SNP variables de la población de 48 individuos que incluyó a la versión convencional y a las tres versiones transgénicas. En todos los cromosomas se detectaron SNP variables (Fig. 4.8.). La mayor parte de los SNP variables se encontró entre los cromosomas 5 y 3, seguidos por los cromosomas 8, 6, y 1, y en menor proporción, en los cromosomas 4, 7, 2 y 9. En el cromosoma 10 se registró un porcentaje cercano a 0 de SNPs variables mientras que un 10% no pudo ser ubicado en ningún cromosoma.

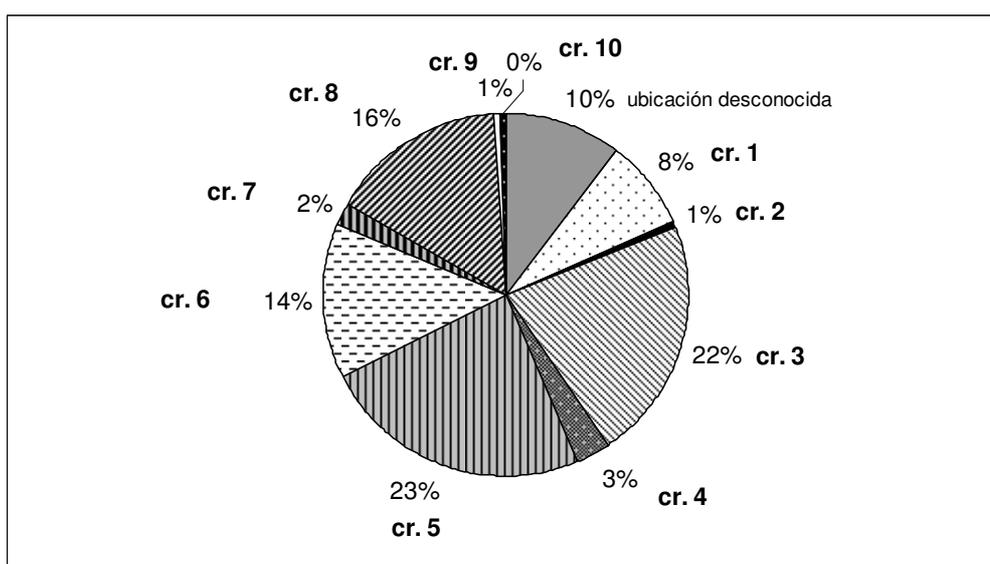


Figura 4.8. Distribución de los SNP variables (n= 4493) entre los 48 individuos de la población de las cuatro versiones del DK747.

Del total de los SNP variables entre las plantas de cada versión, 994 fueron compartidos por las cuatro versiones estudiadas, 1133, entre el DK747 y el DK747MG, y 1068, entre el DK747 y el DK747RR. Si bien se encontraron casos de SNP variables aislados, la mayoría se distribuyeron en tándem, haciendo posible el reconocimiento de regiones variables. Otros SNP resultaron variables exclusivamente entre las plantas del DK747 (214), el DK747MG (47), el DK747RR (164), y otros 4 SNP en el DK747MGRR. Por último, 208 SNP variaron en las poblaciones del DK747RR y el DK747MGRR, 19 en las del DK747, DK747MG y DK747RR, 4 SNP variaron entre las plantas del DK747, DK747RR y DK747MGRR, y 3 SNP variaron entre las plantas de las tres versiones transgénicas (DK747MG, DK747RR y DK747MGRR).

Los SNP que variaron en todas las versiones se distribuyeron en los cromosomas 2, 3, 4, 5 y 8 (Fig. 4.9., tabla 6.2.), y otros en posición desconocida. Particularmente en el cromosoma 5 se detectó una amplia región variable coincidente en las cuatro versiones y que abarcó desde 66805085 hasta 199637696 pb, y otra más chica alrededor de los 26000000 pb. En el cromosoma 3 se detectaron tres regiones con marcadores variables (tabla 6.2.), dos regiones en el cromosoma 8, y una única región en los cromosomas 2 y 4. Se detectaron dos regiones variables solamente entre las plantas del DK747 en el cromosoma 3, alrededor de la región variable para todas las versiones previamente descrita. En una posición cercana se detectaron otras dos regiones variables compartidas entre las versiones DK747 y DK747MG (Fig. 4.9., tabla 6.2.). Los SNP variables exclusivamente entre las plantas del DK747MG se localizaron en el cromosoma 6, entre 157449506 y 162485892 pb, región coincidente con la localización de otros SNP que resultaron variables

en las poblaciones de ambas versiones, convencional y -Bt. Los SNP variables exclusivamente entre las plantas del DK747RR se localizaron en el cromosoma 1, en tres regiones. La primera, entre 56174412 y 65757499 pb, la segunda entre 147727203 y 148126078 pb, y la tercera, entre 165970555 y 170056253 pb. Los cuatro SNP variables exclusivamente entre las plantas del DK747MGRR no se localizaron en tándem sino aislados. Entre el DK747MG y el DK747MGRR compartieron 5 SNP variables, todos alrededor de la posición 135000000 pb en el cromosoma 10, y el DK747RR y el DK747MGRR presentaron 179 SNP variables en ambos en dos regiones del cromosoma 5: entre 173571932 y 199744155 pb y entre 214569239 y 216715465 pb.

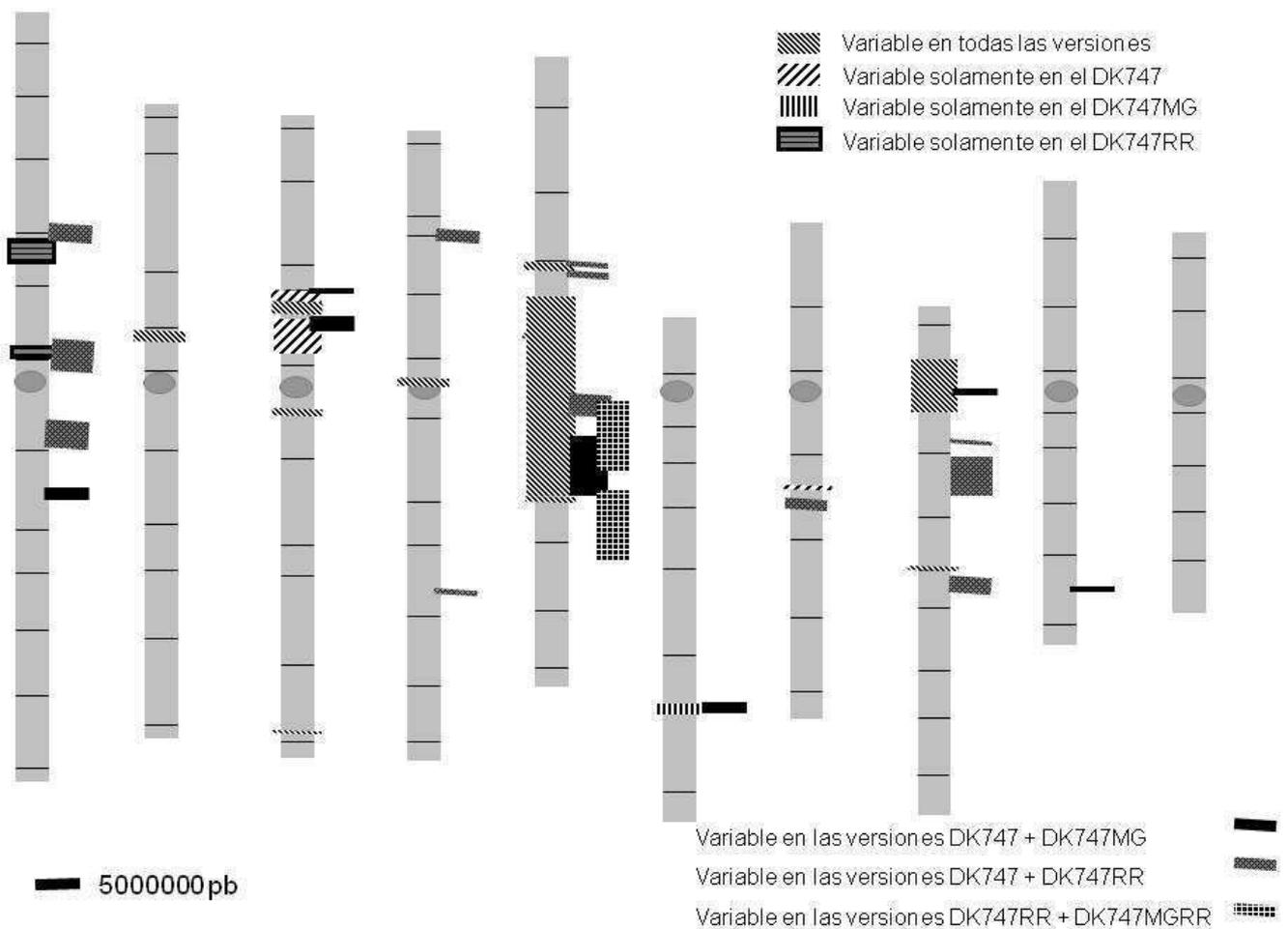


Figura 4.9.

Figura 4.9. Representación esquemática de los cromosomas de maíz ordenados del 1 al 10, indicando las regiones variables más importantes para cada versión particular y las compartidas entre versiones. Los círculos grises representan las regiones centroméricas y las líneas negras las subdivisiones por Bin dentro de cada cromosoma. Ver tabla 6.2., detalle de las regiones variables por versión.

#### 4.4. Discusión

La localización del MON810 (gen de tolerancia a *Diatraea saccharalis*) ha sido estudiada y discutida (Holck et al., 2002; Hernández et.al., 2003; Rosati et al., 2008). En este trabajo se ha localizado por alineamiento de bases al MON810 en el cromosoma 5, en el BIN5.03. Esta localización coincidió en ambos alineamientos independientes correspondientes a cada uno de los extremos de la inserción (5' y 3') estudiados en las bases de datos de secuencias de maíz. A su vez coincide con la localización reportada por Holck et al. (2002), pero no con la reportada por Rosati et al. (2008). En el segundo trabajo mencionado se estudió el extremo 3' del MON810, y al secuenciarlo y realizar un análisis *in silico* fue localizado en el cromosoma 5, pero no en el BIN 5.03 sino en el extremo del cromosoma. Debería estudiarse con más detalle y secuenciarse más allá de 1500 pb hacia cada lado de la inserción para determinar con mayor exactitud la localización.

Respecto a la localización del NK603 (-RR), no se encontraron trabajos que lo ubicaran en el genoma de maíz, ni que aportaran información sobre secuencias flanqueantes al transgén, lo cual dificultó la comprobación por PCR de su localización (Fig. 4.4.), debido a que las secuencias disponibles en la patente no permitieron diseñar más pares de primers que los diseñados y probados en este trabajo. Si bien no se logró comprobar en ambos grupos de híbridos la localización realizada por BLAST, sí coincidieron las localizaciones independientes realizadas con dicha herramienta de los extremos 5' y 3' del

transgén posiblemente ubicadas en el cromosoma 6. Se necesitaría un estudio más detallado sobre la posición de este transgén en el genoma de maíz para comprobar lo observado por el alineamiento en BLAST.

En capítulos anteriores se ha demostrado que las versiones transgénicas difieren en aspectos del crecimiento y desarrollo entre sí y respecto a la versión convencional (Tabla 2.2.). La variabilidad en la eficiencia de captura de la radiación podría explicar las variaciones fenotípicas detectadas en el crecimiento temprano de las plantas ( $TCP_V$ ) entre versiones de un mismo híbrido. Estas diferencias podrían originarse por una expresión genética diferencial debido a efectos epistáticos (Falconer, 1981) relacionados con el lugar del genoma en el que se insertó el transgén o a efectos pleiotrópicos (Ge et al., 2004). Es factible relacionar la ubicación del MON810 y la posible ubicación del NK603 con la posición de QTLs determinantes del crecimiento previamente descritos. Tardieu et al. (2005) localizaron varios QTLs relacionados con la expansión foliar en maíz, dos de éstos cercanos al sitio de inserción del transgén Bt (evento MON810) y otro cercano al sitio de inserción del transgén RR (evento NK603), todos ellos con interacción génica del tipo epistático. Uno de los QTL próximo al transgén Bt regularía la respuesta de la elongación foliar según la demanda atmosférica. Otros dos, uno cercano al evento MON810 y otro cercano al evento NK603, estarían involucrados en la respuesta de la elongación foliar al potencial agua de la hoja. Si la inserción del o los transgenes afectara a estos QTL o a su expresión modificando la expansión foliar, se podrían originar cambios en la captura de la radiación y en el crecimiento temprano de las plantas. Estudios más detallados de la localización de los transgenes, así como su influencia en la expresión genética

de un determinado híbrido o línea ayudarían a dilucidar la interacción entre las diferencias fenotípicas observadas y la introducción de transgenes.

Si bien los resultados obtenidos en los estudios comparativos de microsatélites no arrojaron evidencias de la existencia de variabilidad genética entre las diferentes versiones, el estudio de SNP permitió detectar un 10% de marcadores con más de un alelo en los individuos de la población conformada por las cuatro versiones del DK747, de los cuales solo el 14% correspondieron a individuos idénticos entre sí y heterocigotas. La variabilidad genética dentro de cada versión fue evidente (Fig 4.6.), así como la variabilidad entre plantas dominantes y entre plantas dominadas sólo para la versión -Bt. Contrariamente a lo hipotetizado, la versión convencional fue la que presentó mayor cantidad de marcadores variables entre las plantas, mientras que el DK747MGRR fue la de menor variabilidad genética (Fig. 4.6.). Más aún, entre las plantas del DK747, las plantas del tercil medio y dominantes presentaron mayor variabilidad genética que las dominadas, mientras que las plantas del DK747MGRR presentaron iguales proporciones de SNP variables entre los grupos de plantas dominadas, medias y dominantes (Fig. 4.7.).

Todas estas evidencias dan cuenta de que parte de la variabilidad genética observada se debe a variabilidad genética residual en las líneas parentales. El hecho de que, al momento de la liberación del híbrido convencional al mercado, no se utilizaran marcadores moleculares en alta densidad como los disponibles hoy en día, puede estar relacionado a la mayor variabilidad observada en dicha versión. Esto explicaría por qué el patrón de SNP variables va en disminución conforme el tiempo de liberación de cada una de las versiones al mercado. Por otro lado, la variabilidad genética no se detectó exclusivamente alrededor de

las inserciones, en las versiones transgénicas, como se había propuesto en las hipótesis del trabajo, y como habían demostrado estadísticamente Young y Tanksley (1989). La mayor cantidad de SNP variables no se ubicó exclusivamente en las posiciones determinadas para los transgenes –Bt y –RR (Fig. 4.8. y 4.9.), sugiriendo así, que el padre donante del transgén puede aportar alelos variables no solamente alrededor del inserto, sino en otros cromosomas, o bien que los genotipos parentales de los híbridos presentaban heterocigosis residual. Dado que muchos de los SNP variables presentaron un patrón en el cual parte de la población resultaba homocigota para alguno de los alelos, y el resto de la población resultaba heterocigota y dado que estos patrones se encontraron tanto en las versiones transgénicas como en la convencional, se puede inferir que una de las líneas parentales del híbrido efectivamente presentaba heterocigosis para esos loci, que podría deberse o bien a heterocigosis residual o a una proporción de loci no fijados durante las retrocruzas. Esto concuerda con Stam y Zeven (1981), quienes caracterizaron la proporción del genotipo dador de un alelo en el genotipo receptor, y que, aún luego de 6 retrocruzas, observaron proporciones variables del genotipo dador. Dado que las regiones variables coincidentes en las tres versiones transgénicas, o entre las versiones Bt y BtRR, o entre las versiones RR y BtRR fueron las menos importantes, se sugiere que la variabilidad genética entre las plantas se debe principalmente a la heterocigosis residual en las líneas parentales. Además, el hecho de que una alta proporción de los SNP variables sean compartidos entre las versiones convencional y Bt y convencional y RR (Fig. 4.9.) constituye una evidencia no sólo de que una de las causas más probables sea la heterocigosis residual en los parentales utilizados sino que

además las líneas parentales se fueron fijando (aumento de homocigosis) conforme el paso del tiempo, razón por la cual el híbrido convencional mostraría mayor cantidad de SNP variables que las versiones transgénicas (Fig. 4.6.).

Además se comprobó que el DK747MG fue la única versión que presentó patrones consistentes de SNP variables entre plantas dominantes y dominadas y que éstos SNP se ubican mayormente en el cromosoma 3, en una amplia región entre las posiciones 66929144 y 120827281 pb (BIN 3.04). Cabe destacar que el número de plantas utilizado para esta aproximación fue muy bajo (4 plantas dominantes y 4 dominadas), y que si bien se observó esta tendencia, sólo ocurrió para una de las versiones (Bt). Por lo tanto, si bien estos resultados sugieren que podría relacionarse la dominancia de las plantas con la variabilidad genética (es decir que alguno de los genes de la región presente alelos variables entre las plantas y que éstos afecten el fenotipo de las mismas, Michelmore et al., 1991), con estos datos no se ha podido arribar a una conclusión certera y se necesitan experimentos más completos que respondan esta pregunta.

Generalmente se asume que los híbridos convencionales y transgénicos son genéticamente idénticos excepto por el transgén, debido a que se acepta que luego de 5 o 6 retrocruzas bajo selección del genotipo recurrente se alcanza un genotipo casi idéntico al recurrente, con la excepción de la portación del gen introgresado (Stam y Zeven, 1981). Además se da por supuesto que las plantas de una misma versión son genéticamente idénticas. En este trabajo se demostró que existe variabilidad genética entre las plantas y entre las versiones de un mismo híbrido. Resta determinar si la variabilidad

genética observada se corresponde con la variabilidad fenotípica. Es muy probable que la variabilidad fenotípica entre las plantas se deba en parte a la respuesta diferencial frente a las condiciones ambientales (i.e. alta densidad de siembra), pero también el hecho de haber demostrado que existen diferencias genéticas, permite inferir que éstas podrían estar influenciando el fenotipo.

#### **4.5. Conclusiones**

Se determinó la existencia de variabilidad genética entre plantas mediante el estudio detallado con marcadores SNP. Estos resultados permitieron además determinar que la variabilidad genética no se asocia directamente a la introducción del transgén, sino que la mayor parte proviene de heterocigosis residual en alguna de las líneas parentales del híbrido. A su vez, la historia de liberación al mercado de cada versión está relacionada con el patrón observado. Es por eso que se dedujo que la heterocigosis residual fue disminuyendo con el tiempo en las líneas parentales y por lo tanto la variabilidad genética fue disminuyendo en las versiones transgénicas. Por otro lado, el 45% de los SNP variables se localizaron entre los cromosomas 3 y 5, de manera tal que la variabilidad genética no puede asociarse directamente al arrastre por ligamiento de alelos del padre donante alrededor de los transgenes al ser introgresados en la línea parental del híbrido. Es decir que evidentemente, el arrastre por ligamiento de alelos del padre donante del transgén existe en baja proporción, pero no necesariamente ocurre alrededor del evento introducido, sino que puede ocurrir también en otras regiones del genoma.

## **CAPÍTULO 5**

**Discusión general, implicancias para  
futuras investigaciones y aplicaciones  
futuras**

## 5.1. Discusión general

Al comienzo del presente trabajo eran pocas las evidencias del efecto de la introducción de transgenes en híbridos simples de maíz (Ma y Subedi, 2005; Subedi y Ma, 2007). Del mismo modo, tampoco se conocían muchas evidencias que cuantificaran, con un número importante de marcadores, el arrastre por ligamiento de alelos de la línea donante, durante la introducción de transgenes, ni de heterocigosis residual en las líneas parentales de los híbridos (Tanksley y Nelson, 1996). En este trabajo se demostró no sólo que existen diferencias en rasgos fenotípicos entre distintas versiones de un híbrido (Capítulo 2), sino que también existen diferencias en la variabilidad genética de las mismas (Capítulo 3). Más aún, se describieron diferencias en variabilidad genética que podrían estar afectando los caracteres mencionados (Capítulo 4). Sin embargo, no todas las hipótesis planteadas al comienzo del trabajo resultaron aceptadas.

La primera de las hipótesis en ponerse a prueba fue planteada y probada en el capítulo 2: “Existen variaciones en diversos rasgos del crecimiento y el desarrollo de las plantas de maíz, entre versiones convencionales y transgénicas y entre distintas versiones transgénicas de un mismo grupo de híbridos”. Luego de comparar las medias de diferentes rasgos de crecimiento (tasas de crecimiento de las plantas en diferentes momentos ontogénicos del cultivo, índices de partición) y de desarrollo (largo del ciclo a la antesis y a la floración femenina), se demostró que las distintas versiones de un mismo híbrido presentan alterado el comportamiento de las plantas en diferentes aspectos ecofisiológicos, en ausencia de adversidades bióticas y sin restricciones hídrico-nutricionales. Asimismo, los efectos del transgén de

resistencia al barrenador del tallo o al herbicida glifosato sobre los rasgos de crecimiento y desarrollo variaron entre los dos grupos de híbridos estudiados. Estos resultados brindaron las primeras evidencias de que la introducción del transgén por sí mismo no es la responsable de dicho cambios, sino que existiría una interacción del transgén con el fondo genético. Como se mencionará más adelante, se detectaron diferencias genéticas en todo el genoma y no solamente alrededor del transgén (Capítulo 4), que podrían ser las responsables de la variabilidad en los aspectos ecofisiológicos mencionados.

Si bien se habían documentado diferencias en la respuesta de la  $TCE_{PC}$  a la  $TCP_{PC}$  entre líneas e híbridos de maíz (Echarte y Tollenaar, 2006; Echarte et al., 2005; Pagano et al., 2007; D'Andrea et al., 2008; Rossini et al., 2011), esta información nunca había sido documentada para diferentes versiones de un mismo híbrido. Así, se identificaron respuestas de tipo constitutivas, por ejemplo que en ambas densidades de siembra el DK747MGRR y el DK190MGRR presentaron las  $TCP_{PC}$  más altas, las cuales también se reflejaron en altos valores de  $TCE_{PC}$ . Sin embargo, en ambos materiales se registraron las mayores caídas en la partición de biomasa hacia la espiga para valores extremadamente bajos de  $TCP_{PC}$ , detectándose plantas en las cuales la  $TCE_{PC}$  resultó drásticamente reducida. Para muy bajas  $TCE_{PC}$  (i.e. condiciones de crecimiento con alta competencia logradas en el Exp. 3), el DK747MGRR exhibió una evidente caída del índice de partición (Fig. 2.2.) y la mayor variabilidad poblacional de las  $TCE_{PC}$  (Fig. 3.1.). Además se evidenció una caída en la ER de esta versión (Fig. 2.2.), cuyas causas podrían ser un menor número de flores por espiga, un desarrollo de las flores más lento, o una

menor sincronía en la aparición de estigmas receptivos por encima de las chalas. Para determinar exactamente la o las causas de esta caída de la ER es necesario estudiar cada uno de esos aspectos. Cabe aclarar que en el Exp.3, si bien se lograron muy bajas tasas de crecimiento alrededor del período crítico, también se exacerbó el efecto de la alta presión de competencia sobre la variabilidad entre las plantas del *stand*. En este sentido, en el caso del DK747MGRR, los datos de dicho experimento no mostraron tanta dispersión. Caso contrario, el DK190MGRR, el cual presentó una notable dispersión de ER en el rango de  $TCE_{PC}$  más bajas. Es decir que sería de utilidad repetir un experimento con un diseño que permita una comparación mediante un análisis de la varianza, pero con una presión de competencia similar a alcanzada en el Exp.3.

Interesantemente, se detectó un consistente adelanto de la floración en el DK747RR, así como en el DK190RR en  $D_{12}$  en el Exp 2 (Tabla 2.2.) Este adelanto del TT a *silking* pudo, en parte relacionarse con las altas  $TCE_{PC}$  presentadas por estas versiones (Borrás et al., 2007). No obstante, entre los híbridos DK747, las mayores  $TCE_{PC}$  las había presentado el DK747MGRR, el cual no adelantó el *silking* tanto como el DK747RR. Esto pudo explicarse en el tercer capítulo al realizar un análisis de la variabilidad fenotípica de los distintos rasgos. Así, se demostró que la distribución de las  $TCE_{PC}$  del DK747MGRR presentó una distribución normal con tendencia a una campana achatada (platicúrtica) y algunas plantas de la población con menores  $TCE_{PC}$  y atraso en la emergencia de estigmas (asimetría negativa). Por el contrario, para el DK747RR, la distribución de  $TCE_{PC}$  resultó normal, con una fuerte concentración de los datos alrededor de la media (leptocúrtica) y algunas

plantas con mayores valores de  $TCE_{PC}$  (asimetría positiva) y floraciones más tempranas (Tabla 6.1.).

La segunda hipótesis que se puso a prueba fue la desarrollada en el capítulo 3: “Las versiones transgénicas presentan mayor variabilidad fenotípica que las versiones convencionales y las versiones con eventos apilados presentarán la mayor variabilidad fenotípica de todas las versiones de un mismo híbrido”. Pocos estudios exploraron los cambios en la variabilidad poblacional de la  $TCP_{PC}$  y  $TCE_{PC}$  ante distintas condiciones de crecimiento (Vega y Sadras, 2003; Echarte y Tollenaar, 2006; Mayer et al., 2012) pero nunca se abordó este tema comparando híbridos convencionales y transgénicos. Tal como se había observado para los efectos sobre los valores medios, los efectos sobre la variabilidad de las versiones del grupo DK747 fueron más claros y consistentes que los observados para el grupo DK190. Sin embargo los efectos de la introducción del transgén sobre la variabilidad fenotípica no fueron los hipotetizados: no todos los caracteres aumentaron la variabilidad del mismo modo en una misma versión, y más aún, en algunos caracteres la variabilidad del DK747 fue mayor a la del DK747MGRR (Tabla 6.1.), por lo que no pudo asociarse la introducción de transgenes a un aumento en la variabilidad fenotípica. No obstante, sí se detectaron diferencias entre las poblaciones de las distintas versiones, evidenciándose una menor variabilidad en el rinde del DK747MG (Fig. 3.1.), sugiriendo una mayor tolerancia de este genotipo a los estreses abióticos (Tollenaar y Wu, 1999).

Por último, las hipótesis planteadas en el capítulo 4 formulaban que “las versiones transgénicas presentan mayor variabilidad genética que las versiones convencionales y las versiones con eventos apilados presentarán la

mayor variabilidad de todas las versiones del grupo de híbridos” y que “existe asociación entre las variaciones fenotípicas y las variaciones genotípicas entre las plantas de una misma versión” fueron rechazadas. Si bien con el estudio de microsatélites no se logró abordar una respuesta a las preguntas planteadas, el estudio de SNP sí logró dilucidar algunas de ellas. Contrariamente a la primera de las hipótesis propuestas en el capítulo 4, el DK747 convencional fue la versión con mayor cantidad de SNP variables dentro de la población, mientras que la versión con transgenes apilados mostró la menor variabilidad genética. Por otro lado, la variabilidad genética no se concentró alrededor de la ubicación estimada para los transgenes, sino a lo largo de todo el genoma, por lo que la suposición con la cual se comenzó el trabajo que asumía que el arrastre por ligamiento de alelos del padre donante del transgén ocurriría a los lados del evento, no resultó cierta. Sí se detectó una evidencia de que puede haber existido tal arrastre de loci del padre donante (i.e. regiones variables en las versiones transgénicas), pero no alrededor del transgén, sino en diversas regiones en otros cromosomas. No obstante cabe aclarar que gran parte de las diferencias genéticas observadas se deben a heterocigosis residual en alguna de las líneas parentales, ya que muchos de los marcadores variables presentaron patrones de la población con individuos heterocigotas y homocigotas para el locus en estudio. Por otro lado, la sostenida disminución de variabilidad en transgénicos (Fig. 4.6 a.) podría deberse a una mayor fijación de loci en homocigosis en las líneas parentales entre el lanzamiento de la versión convencional y el lanzamiento del transgénico, sumado al hecho de que durante ese período de tiempo, en el maíz la tecnología permitió pasar de utilizar relativamente pocos marcadores moleculares a disponer de decenas o

cientos de miles de marcadores a un costo mucho menor. Si bien no es posible con estos resultados discernir el origen de la variabilidad genética cuantificada, la ubicación no coincidente con la de los eventos transgénicos y el tipo de segregación observado permiten inferir que es más probable que la misma provenga de heterocigosis residual en las líneas parentales, aunque no se puede descartar un arrastre por ligamiento de la línea donante del evento transgénico, no necesariamente alrededor del transgén, sino en otras regiones genómicas. Es destacable también que algunas de las regiones más variables coinciden con regiones centroméricas, heterocromáticas, las cuales en su mayoría no suelen contener genes, y por lo tanto no están sujetos a selección. Sería interesante estudiar también las regiones de los knobs, ya que también son regiones heterocromáticas capaces de acumular mutaciones.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos permiten hipotetizar que si las diferencias fenotípicas observadas se deben a un efecto genético, éste debería ser epistático. Otra posibilidad es una expresión genética diferencial que da como resultado una interacción genotipo x ambiente diferente entre las versiones. Quedan por estudiar en detalle las causas genéticas y los mecanismos fisiológicos que están por detrás de las diferencias observadas entre híbridos convencionales y transgénicos, o entre versiones transgénicas.

El hecho de que algunos de los caracteres fenotípicos hayan sido más variables en el DK747 (e.g. Rinde y NGP), coincide con la mayor variabilidad genética detectada por los SNP. Por lo tanto, ésta podría estar relacionada con la variabilidad fenotípica de los caracteres mencionados. Tanto las regiones asociadas al sitio de inserción del transgén, como a la variabilidad genética

observada, pueden ser asociadas a numerosos genes previamente descritos (e.g. genes de morfogénesis de hojas, morfogénesis de granos, factores de transcripción, relacionados a la morfología de la panoja y a la espiga, etc.). Sin embargo, si bien se podría inferir el efecto de la variabilidad genética por la ubicación de la misma y su solapamiento con algunos de los genes mencionados, los rasgos ecofisiológicos estudiados son caracteres cuantitativos controlados por numerosos genes y por lo tanto la inferencia sería incorrecta o incompleta. Como medidas de variabilidad fenotípica se utilizó el coeficiente de variación, la amplitud de las distribuciones poblacionales y el coeficiente de asimetría. La variabilidad en el CV de la mayoría de los caracteres no se explicó por la variabilidad genética detectada (Fig. 5.1a.). No obstante, en este trabajo sí se lograron relacionar las medidas de dispersión de algunos caracteres con el número de SNP variables (Fig. 5.1b y c.). Solamente se observó una tendencia de aumento de CV del NGP en función del número de SNP variables ( $r^2 = 0.49$ ). Del mismo modo, la variabilidad en amplitud de las distribuciones de BT y de la ER pueden explicarse por un aumento en la variabilidad genética ( $r^2 = 0.49$  y  $0.69$  para BT y ER, respectivamente; Fig. 5.1b.). Cabe aclarar que si bien se encontró una fuerte tendencia para la ER, la recta ajustada pareciera estar definida por los puntos extremos, por lo que se puede afirmar que existe una relación entre ambos caracteres, pero no que necesariamente sea lineal. Por último, se encontró que un aumento en el coeficiente de asimetría de las distribuciones de  $TCP_{PC}$  en gran parte estuvo asociado a la variabilidad genética ( $r^2 = 0.91$ ; Fig. 5.1c.), lo que implica que a mayor cantidad de SNP variables, la población desvía hacia valores más altos de  $TCP_{PC}$  (mayor jerarquización de plantas con la aparición de individuos con

mayores  $TCP_{PC}$ ). Los resultados obtenidos permitieron relacionar un aumento en la variabilidad genética con aumentos en algunas de las medidas de variabilidad fenotípica para los rasgos BT, NGP y  $TCP_{PC}$ , sin embargo, resta describir en detalle las causas fisiológicas detrás de estas asociaciones.

Figura 5.1. Relación entre los CV (a), la amplitud de las distribuciones poblacionales (b) y el coeficiente de asimetría (c) con el número de SNP variables, para el conjunto de versiones del DK747. Se muestran los puntos y las regresiones en  $D_{12}$ . Se muestran los valores de  $r^2$  al lado de cada uno de los ajustes.

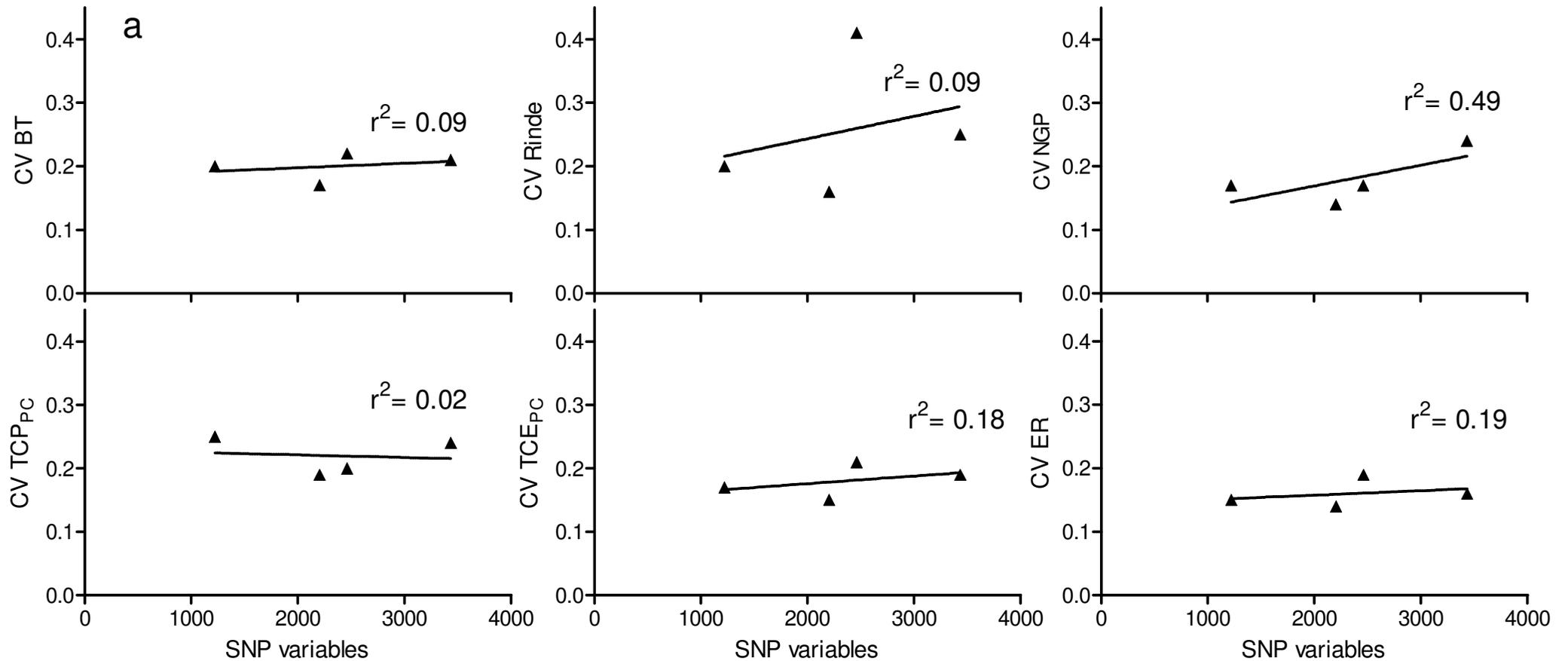


Fig.5.1. (continuación)

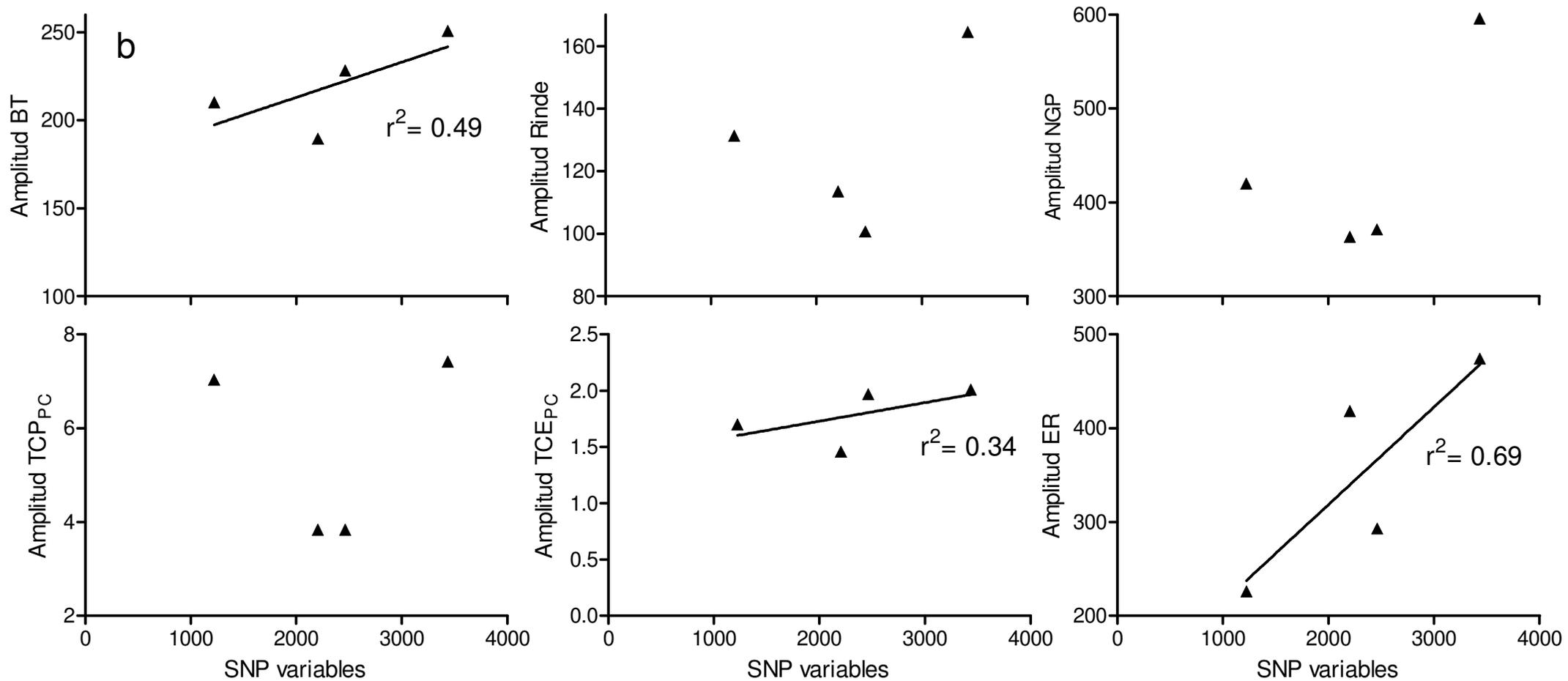
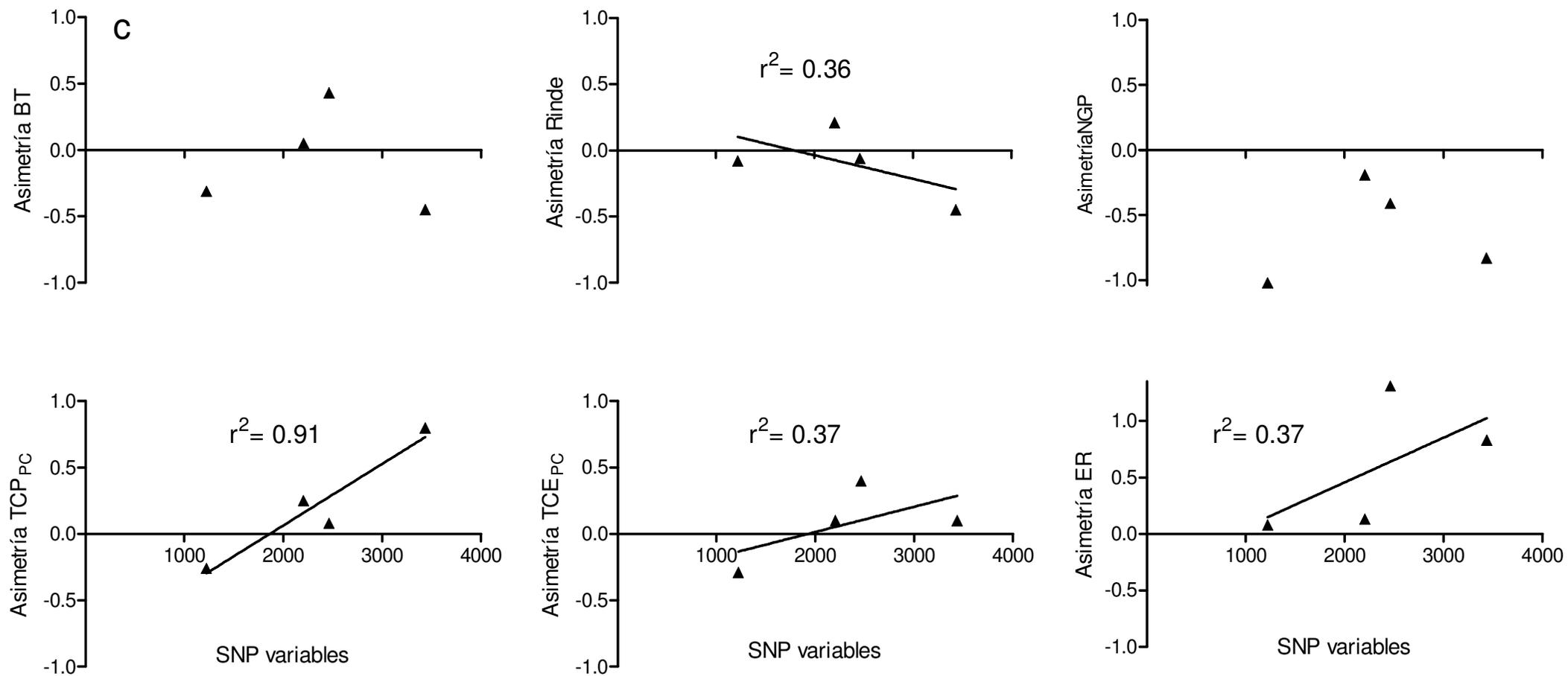


Fig.5.1. (continuación)



## **5.2. Implicancias para futuras investigaciones y aplicaciones futuras**

En este trabajo se evidenciaron diferencias en distintos caracteres eco-fisiológicos, en la variabilidad fenotípica de dichos caracteres, y en la variabilidad genética entre las distintas versiones de un híbrido comercial. También se demostró que las diferencias no son constantes entre grupos de híbridos. Desde la introducción de los híbridos transgénicos al mercado numerosos trabajos científicos han intentado describir las consecuencias ecológicas del uso de maíces Bt sobre el ambiente (ej. Naranjo, 2009; Yu et al., 2001). Por otro lado, los estudios comparativos del comportamiento de maíces Bt y sus versiones convencionales describen, en general, los efectos benéficos de la resistencia a la adversidad en términos de la producción de biomasa y del rendimiento en grano del cultivo (Traore et al. 2000; Archer et al., 2001; Stanger y Lauer, 2006; Subedi y Ma, 2007; Coulter et al., 2010). Hasta el momento de realizarse este trabajo, era escasa la exploración de las bases eco-fisiológicas del diferente comportamiento de híbridos convencionales y sus versiones transgénicas. Profundizar sobre el estudio de las bases fisiológicas y genéticas de las diferencias observadas entre versiones de un híbrido de maíz permitiría por un lado, ajustar la metodología de control de genotipos transgénicos previa a la introducción al mercado y por otro, aprovechar aquellas características que resulten favorables en las versiones transgénicas. Particularmente, estudiar las causas de la caída en la ER del DK747MGRR podría ser de interés para aprovechar las altas  $TCE_{PC}$  y convertirlas en mayores rendimientos de esa versión.

Para profundizar sobre el rol de la variabilidad genética en la variabilidad fenotípica, así como en los aspectos ecofisiológicos diferenciales entre las

versiones, una primera aproximación consistiría en determinar genes candidatos en las posiciones en las que se encontraron SNP variables. Pero eso no establece una relación de causa y efecto, sino que además se deberían estudiar los mismos caracteres fenotípicos en poblaciones de líneas recombinantes endocriadas (RILs) y posteriormente confirmar los QTL. Más aún, luego del análisis de QTL se podrían determinar genes candidatos y trabajar con mutantes de esos genes. Otra posibilidad consiste en utilizar EcoTILLING, la cual combina una técnica de mutagénesis con una técnica de screening de ADN que identifica mutaciones puntuales en un gen blanco. De esta manera se podrían estimar los efectos concretos de los loci sobre el fenotipo.

Por todo lo demostrado a lo largo de este trabajo, es importante que se conozca minuciosamente la pureza de las líneas parentales, así como el control de las líneas donantes de eventos y su posible contribución a la variabilidad genética de los híbridos transgénicos. Asimismo se debe conocer la interacción entre el fondo genético de los híbridos y la introducción de los diferentes eventos, en la expresión fenotípica resultante. De esta manera se podrán utilizar los conocimientos obtenidos en esta tesis para optimizar el proceso de mejoramiento para la obtención de líneas endocriadas de manera de obtener incrementos sostenidos en el rendimiento de los cultivos de maíz.

## **CAPÍTULO 6**

### **Anexo**

Tabla 6.1. Estadística descriptiva y test de normalidad para la biomasa total, Rinde, TCP<sub>PC</sub>, TCE<sub>PC</sub>, NGP, Peso de grano, ER, TT a antesis y TT a silking para los híbridos DK747, DK747MG, DK747RR, DK747MGRR, DK190MG, DK190RR y DK190MGRR en D<sub>6</sub> y D<sub>12</sub>. La estadística descriptiva y los test de normalidad se realizaron sobre el conjunto total de plantas medidas en las tres réplicas y durante los Exp 1 y Exp 2.

		DK747		DK747MG		DK747RR		DK747MGRR		DK190MG		DK190RR		DK190MGRR	
		D <sub>6</sub>	D <sub>12</sub>												
<b>Biomasa total</b> <b>(g)</b>	<b>Media</b>	380,18	219,66	377,02	221,71	370,31	207,39	382,23	222,83	375,204	198,302	353,5	207,54	349,45	207,32
	<b>CV</b>	0,12	0,21	0,13	0,17	0,12	0,22	0,09	0,2	0,14	0,23	0,17	0,2	0,16	0,19
	<b>Mínimo</b>	232,23	61,86	196,25	118,33	242,64	120,77	303,72	120,94	262,9	24,76	191,26	101,47	254,54	131,58
	<b>Mediana</b>	389,21	217,34	378,67	217,53	376,22	209,6	381,96	225,7	361,99	200,11	362,85	205,99	344,49	212,6
	<b>Máximo</b>	483,55	312,68	467,91	307,08	481,43	349,05	464,8	331,18	513,68	275,65	486,3	289,57	511,83	281,83
	<b>Asimetría</b>	-0,8	-0,45	-0,77	0,05	-0,24	0,43	0,13	-0,31	0,32	-0,83	-0,37	0,015	0,71	-0,062
	<b>Curtosis</b>	1,41	1,31	1,54	-0,02	0,02	0,83	-0,09	0,1	-0,17	2,15	-0,17	-0,51	0,38	-0,91
	<b>test de normalidad</b> <b>(P)</b>	0,04	0,2	0,07	0,69	0,62	0,19	0,36	0,49	0,36	0,01	0,55	0,31	0,04	0,21
	<b>n</b>	59	60	59	59	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<b>Rinde</b> <b>(g)</b>	<b>Media</b>	204,88	113,31	199,78	114,02	198,69	120,02	202,24	117,16	199,79	100,78	193,39	108,53	186,79	107,64
	<b>CV</b>	0,10	0,25	0,12	0,16	0,10	0,41	0,08	0,20	0,17	0,24	0,15	0,19	0,15	0,18
	<b>Mínimo</b>	126,16	8,61	108,19	56,42	150,58	56,25	165,86	55,71	18,63	0	95,92	42,96	130,01	62,9
	<b>Mediana</b>	205,81	109,45	202,65	115,11	200,78	107,73	201,67	118,6	196,4	103,58	191,76	104,09	182,82	106,82
	<b>Máximo</b>	260,03	173,1	243,17	169,91	258,56	156,9	246,55	187,08	275,73	148,28	279,51	157,04	281,46	149,39
	<b>Asimetría</b>	-0,8	-0,45	-0,92	0,21	0,06	-0,06	0,14	-0,08	-1,19	-1,22	-0,077	-0,082	0,81	-0,082
	<b>Curtosis</b>	1,56	1,53	1,32	-0,14	-0,66	-0,36	-0,17	0,08	6,09	3,06	-0,53	-0,18	0,68	-0,88
	<b>test de normalidad</b> <b>(P)</b>	0,01	0,09	0,01	0,72	0,4	0,828	0,65	0,87	0	0,0004	0,81	0,62	0,02	0,2
	<b>n</b>	59	60	59	59	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60

		DK747		DK747MG		DK747RR		DK747MGRR		DK190MG		DK190RR		DK190MGRR	
		D <sub>6</sub>	D <sub>12</sub>												
<b>TCP<sub>PC</sub></b> <b>(g d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Media</b>	7,32	4,51	6,91	4,57	7,59	4,76	7,44	4,83	6,65	3,92	6,13	3,79	6,58	4,41
	<b>CV</b>	0,14	0,24	0,14	0,19	0,13	0,20	0,13	0,25	0,16	0,19	0,15	0,16	0,17	0,18
	<b>Mínimo</b>	5,96	1,42	3,85	2,47	6,13	2,77	5,42	0,59	4,11	2,29	4,34	2,44	2,99	2,2
	<b>Mediana</b>	7,89	4,39	7,73	4,35	8,79	4,55	8,01	4,69	6,83	3,53	7,1	3,78	6,79	4,11
	<b>Máximo</b>	10,87	8,84	9,97	6,31	12,3	6,61	11,03	7,63	10,37	7,01	10,76	5,45	10,63	5,98
	<b>Asimetría</b>	0,54	0,8	-0,61	0,25	0,19	0,08	0,26	-0,26	0,3	1,23	0,25	0,38	0,085	0,027
	<b>Curtosis</b>	-0,24	2,99	1,67	-0,67	0,2	-0,62	-0,48	0,44	-0,52	2,74	0,13	-0,47	1,29	-0,47
	<b>test de normalidad (P)</b>	0,04	0,01	0,02	0,29	0,63	0,49	0,51	0,92	0,4	0,002	0,77	0,23	0,19	0,41
	<b>n</b>	59	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<hr/>															
<b>TCE<sub>PC</sub></b> <b>(g d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Media</b>	2,26	1,59	2,05	1,45	2,42	1,70	2,56	1,90	2,32	1,63	1,94	1,48	2,57	1,97
	<b>CV</b>	0,11	0,19	0,14	0,15	0,17	0,21	0,10	0,17	0,15	0,18	0,15	0,15	0,13	0,17
	<b>Mínimo</b>	1,42	0,42	1,31	0,78	1,47	0,71	1,95	1,02	1,23	0,49	1,35	1,11	1,63	0,99
	<b>Mediana</b>	2,26	1,4	1,85	1,23	2,29	1,61	2,53	1,9	2,11	1,46	2,29	1,73	2,28	1,81
	<b>Máximo</b>	5,17	2,43	3,5	2,24	4,12	2,68	3,14	2,72	3,84	2,24	3,38	2,4	3,19	2,72
	<b>Asimetría</b>	1,33	0,1	1,11	0,1	0,93	0,4	0,13	-0,29	1,11	-0,34	0,41	0,04	0,45	0,322
	<b>Curtosis</b>	1,3	-0,64	0,51	0,56	-0,04	0,62	0,08	-0,36	5,74	1,17	0,013	-0,46	0,24	0,211
	<b>test de normalidad (P)</b>	0	0,049	0	0,0006	0,0002	0,16	0,95	0,44	0,0003	0,63	0,63	0,94	0,34	0,59
	<b>n</b>	59	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60

		DK747		DK747MG		DK747RR		DK747MGRR		DK190MG		DK190RR		DK190MGRR	
		D <sub>6</sub>	D <sub>12</sub>												
<b>NGP</b>	<b>Media</b>	693.73	451.08	653.75	465,35	668,71	461.40	653.57	455.85	760.1	438.97	782.47	454.02	776.57	458.05
	<b>CV</b>	0.10	0.24	0.09	0.14	0.07	0.17	0.10	0.17	0.17	0.19	0.20	0.15	0.16	0.15
	<b>Mínimo</b>	542	45	542	260	502	239	520	174	513	224	442	327	518	256
	<b>Mediana</b>	684	457.5	657	476	677	474	650	466	733	445	781	439	518	256
	<b>Máximo</b>	1020	641	872	623	850	610	890	594	1038	584	1057	620	1072	591
	<b>Asimetría</b>	1.36	-0.83	0.20	-0.19	0.04	-0.41	0.88	-1.02	0.30	-0.36	0.17	0.18	0.18	-0.58
	<b>Curtosis</b>	4.92	1.51	3.02	-0.35	0.69	0.02	2.19	1.04	-1.07	0.16	-0.96	-1.20	-0.88	-0.17
	<b>test de normalidad (P)</b>	0.00	0.04	0.00	0.29	0.84	0.42	0.03	0.00	0.01	0.18	0.12	0.01	0.22	0.10
<b>n</b>	59	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
<hr/>															
<b>Peso Grano (mg)</b>	<b>Media</b>	296.01	252.65	306.03	245.25	297.05	228.32	310.71	257.03	260.45	232.08	251.52	240.13	244.01	235.28
	<b>CV</b>	0.09	0.10	0.10	0.09	0.08	0.12	0.08	0.11	0.13	0.12	0.14	0.15	0.17	0.12
	<b>Mínimo</b>	192.32	176.81	224.38	194.85	236.57	152.28	247.92	194.11	154.02	152.18	171.75	123.66	154.16	151.33
	<b>Mediana</b>	297.90	253.36	312.88	243.98	302.08	229.22	309.20	253.15	275.55	233.74	255.93	240.96	244.89	234.04
	<b>Máximo</b>	361.47	346.36	359.28	303.95	357.10	299.18	360.74	339.66	379.62	310.98	325.00	361.69	333.80	332.38
	<b>Asimetría</b>	-0.67	0.24	-0.59	0.35	-0.37	0.04	-0.31	0.71	-0.64	-0.05	-0.13	0.02	0.08	0.27
	<b>Curtosis</b>	1.23	0.76	-0.38	-0.14	-0.39	-0.43	-0.10	0.97	1.80	1.02	-0.67	1.58	-0.42	0.31
	<b>test de normalidad (P)</b>	0.12	0.78	0.02	0.69	0.23	0.75	0.34	0.06	0.01	0.57	0.43	0.10	0.73	0.81
<b>n</b>	59	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60	

		DK747		DK747MG		DK747RR		DK747MGRR		DK190MG		DK190RR		DK190MGRR	
		D <sub>6</sub>	D <sub>12</sub>												
<b>ER</b>	<b>Media</b>	297,45	317,83	336,53	362,28	282,95	285,5	256,78	244,38	287,73	301,81	261,37	262,55	248,99	260,86
	<b>CV</b>	0,14	0,16	0,13	0,14	0,17	0,19	0,10	0,15	0,16	0,20	0,15	0,14	0,14	0,16
	<b>Mínimo</b>	158,36	98,8	201,81	178,83	141,14	187,94	203,18	126,22	143,07	16,19	175,35	175,51	109,58	171,09
	<b>Mediana</b>	283,58	300,88	347,13	359,35	281,78	273,94	256,53	247,01	285,21	297,38	264,43	254,51	245,07	265,24
	<b>Máximo</b>	493,55	573,11	498,8	597,22	435,73	481,11	316,61	352,43	453,37	516,54	393,03	396,59	348,26	374,4
	<b>Asimetría</b>	0,13	0,83	-0,37	0,13	-0,09	1,31	0,23	0,08	0,34	-0,24	0,39	0,92	-0,47	0,24
	<b>Curtosis</b>	-0,98	0,76	-0,45	0,53	-0,75	2,34	-0,43	0,83	1,97	4,59	0,32	1,67	1,75	0,14
	<b>test de normalidad (P)</b>	0,06	0,002	0,02	0,88	0,47	0,0002	0,81	0,5	0,01	0,18	0,12	0,01	0,22	0,1
	<b>n</b>	59	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<b>TT antesis</b>	<b>Media</b>	918,76	967,34	933,20	969,56	914,23	950,92	923,91	968,71	955,71	1001,30	949,79	988,06	952,41	986,56
	<b>CV</b>	0,43	0,49	0,39	0,45	0,45	0,53	0,37	0,49	0,46	0,41	0,45	0,37	0,39	0,41
	<b>Mínimo</b>	841,4	901,51	892,4	910,2	867,17	892,4	883,71	924,5	910,2	955,56	901,51	937,41	910,2	910,2
	<b>Mediana</b>	919,21	963,73	937,41	971,9	910,2	938,3	919,21	971,9	955,56	993,91	953,8	989,6	953,8	991,75
	<b>Máximo</b>	976,06	1051,5	976,06	1038,76	976,06	1021,31	955,56	1038,76	1006,51	1051,5	1007,5	1038,76	1007,5	1051,5
	<b>Asimetría</b>	-0,72	0,27	0,13	-0,08	0,16	0,38	0,033	0,27	0,14	0,78	0,43	-0,32	0,46	-0,37
	<b>Curtosis</b>	1,26	-0,41	-0,12	-0,57	0,33	-0,54	-0,79	-0,75	-0,71	0,89	-0,61	-0,19	-0,34	-0,31
	<b>test de normalidad (P)</b>	0,01	0,05	0,006	0,06	0,33	0,04	0,005	0,005	0,03	0,0003	0,002	0,03	0,01	0,09
	<b>n</b>	60	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60

		<b>DK747</b>		<b>DK747MG</b>		<b>DK747RR</b>		<b>DK747MGRR</b>		<b>DK190MG</b>		<b>DK190RR</b>		<b>DK190MGRR</b>	
		<b>D<sub>6</sub></b>	<b>D<sub>12</sub></b>												
<b>TT silking</b>	<b>Media</b>	931,23	1001,80	943,57	1000,60	925,43	975,57	933,18	990,8	965,22	1032,80	961,47	1018,30	957,17	1011,40
	<b>CV</b>	0,45	0,5	0,45	0,47	0,52	0,52	0,42	0,58	0,49	0,58	0,48	0,4	0,43	0,52
	<b>Mínimo</b>	857,6	937,405	892,4	910,2	883,71	910,2	892,4	910,2	910,2	993,91	910,2	955,56	892,4	910,2
	<b>Mediana</b>	937,41	1006,51	938,3	1006,51	919,21	973,98	937,41	989,6	971,9	1021,4	954,68	1007,5	955,56	1014,4
	<b>Máximo</b>	993,91	1099,53	993,91	1080,94	1038,76	1065,66	993,91	1099,53	1007,5	1199,07	1035,2	1080,94	1007,5	1104,6
	<b>Asimetría</b>	-0,35	0,43	0,07	-0,2	1,27	0,34	-0,1	0,56	0,007	2,565	0,53	0,32	-0,021	-0,46
	<b>Curtosis</b>	0,31	0,21	-0,55	-0,31	2,86	-0,22	-0,43	0,52	-0,68	10,15	-0,53	-0,18	-0,57	0,195
	<b>test de normalidad (P)</b>	0,02	0,02	0,07	0,2	0,0003	0,07	0,003	0,061	0,013	0	0,003	0,002	0,07	0,023
<b>n</b>	60	60	59	60	58	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

Tabla 6.2. Localización de los SNP variables entre las plantas. Se detallan los SNP variables exclusivamente en las poblaciones de cada una de las versiones, los compartidos en cada combinación de dos versiones, los compartidos en cada combinación de tres versiones y los compartidos por todas las versiones. Las posiciones se indican en pb. Los guiones indican un intervalo entre dos posiciones que delimitan una región de SNP variables.

Versión y combinaciones	total SNP variables	cromosoma	posición (pb)		
DK747 exclusivamente	214	desconocido	-		
		1	Desconocida 221793890- 221994088		
		3	Desconocida 22461858- 25843911		
			38273622- 60610271		
		4	1988255		
		5	100854832		
		6	12776867		
		7	Desconocida 140912237- 141551247		
		<hr/>			
		DK747MG exclusivamente	47	desconocido	-
3	Desconocida 104752165 157530874				
4	2586332 181257363 199479936				
6	Desconocida 157449506- 162485892				
7	Desconocida				
8	24440197 24440224 170273668				
<hr/>					
DK747RR exclusivamente	164			desconocido	-
				1	Desconocida 56174412- 65757499 147727203- 148126078 156970555- 170056253 254381912 291034748
				2	98653319
		4	Desconocida 17191465- 17310349 108458969		
		6	13760190		
		7	Desconocida 99801321 132580248		

		8	29427359
		10	138470185
DK747MGRR exclusivamente	4	2	205036598
		4	84087478
		5	17903871
		7	15706032
DK747 y DK747MG	1133	desconocido	-
		1	214755601- 221566909
		2	Desconocida
		3	Desconocida
			27197515- 29694120
			57078144- 168443662
			186714616
			225190422
		4	515015
			515187
			596470
			609379
			695852
			827384
			68250081
		5	Desconocida
			154773707- 156547335
			168869937- 201430650
		6	Desconocida
			156644563- 163712119
		7	20954691
			24789973- 24790040
			24937862
		8	Desconocida
			12677037
			17100885
		9	Desconocida
			114485514
			151002781- 152191277
		10	Desconocida
DK747 y DK747RR	1068	desconocido	
		1	Desconocida
			40292245- 53261218
			65948646- 85365205
			147355101- 164808430
		2	Desconocida
		3	213191038- 213286679
		4	Desconocida
			10202935- 17126215
			29027632

			195516306- 196819940
		5	Desconocida
			20492709- 24405413
			144467359- 159461804
		7	Desconocida
			141852478- 147934167
		8	Desconocida
			759995- 1510185
			20731158- 71270979
			128348263- 144767487
DK747 y DK747MGRR	0		
DK747MG y DK747RR	0		
DK747MG y DK747MGRR	5	10	Desconocida
			134211006- 135658565
DK747RR y DK747MGRR	208	desconocido	
		1	Desconocida
			3154593- 3341556
		3	37027520
			3159075- 3341556
		4	152068761
		5	Desconocida
			173571932- 199744155
			214569239- 216715465
DK747, DK747MG y DK747RR	19	1	Desconocida
		5	Desconocida
			152095801- 156871656
		8	24373400
DK747, DK747MG y DK747MGRR	0		
DK747, DK747RR y DK747MGRR	4	3	32449580
			35254762
		5	32449580
		8	23108645
DK747MG, DK747RR y DK747MGRR	3	1	Desconocida
		10	16573566
			91962616
DK747, DK747MG, DK747RR y DK747MGRR	994	desconocido	
		1	117394362
		2	Desconocida
			28811767- 34009513
			229447361
		3	Desconocida
			31061146- 37727756
			145493426- 148155393
			222875822- 223696318
		4	desconocida

	6403646- 10190384
5	desconocida
	24483122- 27970086
	66805085- 199637696
8	desconocida
	2995771- 20551443
	146390260- 147551087

---

## Bibliografía

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., Steinrücken, H.C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 66, 830-834.
- Andrade, F.H., Abatte, P.E. 2005. Response of maize and soybean to variability in stand uniformity. *Agron. J.* 97, 1263- 1269.
- Andrade, F.H., Echarte, L., Rizzalli, R., Della Maggiora, A., Casanovas, M., 2002. Kernel number prediction in maize under nitrogen or water stress. *Crop Sci.* 42, 1173-1179.
- Andrade, F.H., Vega, C.R.C., Uhart, S.A., Cirilo, A.G., Cantarero, M., Valentinuz, O.R., 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Sci.* 39, 453-459.
- Archer, T.L., Patrick, C., Schuster, G., Cronholm, G., Bynum Jr, E.D., Morrison, W.P., 2001. Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuriangiensis* transgenic maize. *Crop Prot.* 20, 139-144.
- Ballaré, C.L., Casal, J.J. 2000. Light signals perceived by crop and weed plants. *Field Crops Res.* 67, 149- 160.
- Behr, C.F., Heck, G.R., Hironaka, C.H., You, J., 2004. Corn plants comprising event PV-ZMGT32 (NK603). En: US 6, 400 B2 Ed., USA.
- Blake, T.J., Reid, D.M., Rood, S.B., 1983. Ethylene, indoleacetic acid and apical dominance in peas: a reappraisal. *Physiol. Plantarum* 59, 481-487.
- Boomsma, C.R., Santini, J.B., Tollenaar, M., Vyn, T.J., 2009. Maize morphophysiological responses to intense crowding and low nitrogen availability: an analysis and review. *Agron. J.* 101, 1426-1452.
- Boote, K.J., Loomis, R.S., 1991. The prediction of canopy assimilation, in: Boote, K.J., Loomis, R.S. (Eds.), *Modeling crop photosynthesis*, pp. 109-140.
- Borrás, L., Westgate, M.E., Astini, J.P., Echarte, L. 2007. Coupling time to *silking* with plant growth rate in maize. *Field Crops Res.* 102, 73-85.
- Cárcova, J., Otegui, M.E., 2001. Ear temperature and pollination timing effect on maize kernel set. *Crop. Sci.* 41, 41, 1809-1815.
- Cárcova, J., Otegui, M.E., 2007. Ovary growth and maize kernel set in maize. *Crop. Sci.* 47, 1104- 1110.
- Caviglia, O.P., Melchiori, R.J.M., 2011. Contribution of contrasting plant hierarchies to the response to N fertilizer in maize. *Field Crops Res.* 122, 131-139.
- Charles- Edwards, D.A. 1984. On the order development of plants. 1 An hipóthesis. *Ann.Bot.- London* 53, 699- 707.

- Cline, M.G., 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plantarum* 90, 230-237.
- Cooper, C.L., Mac Donald, P.W. 1970. Energetics of early seedling growth in corn (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 10, 136- 139.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881-10890.
- Coulter, J.A., Nafziger, E.D., Janssen, M.R., Pedersen, P., 2010. Response of Bt and near-isoline corn hybrids to plant density. *Agron.J.* 102, 103-111.
- D'Andrea, K.E., Otegui, M.E., Cirilo, A.G., 2008. Kernel number determination differs among maize hybrids in response to nitrogen. *Field Crops Res.* 105, 228-239.
- Daynard, T.B., Muldoon, J.F. 1983. Plant- to- plant variability of maize plants grown at different densities. *Can. J. Plant Sci.* 63, 45- 59.
- de Vries, B., Fehr, W., 2011. Impact of the MON89788 event for glyphosate tolerance on agronomic and seed traits of soybean. *Crop Sci.* 51, 1023-1027.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., J.S.Mattick, 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19.
- Donald, C.M. 1981. Competitive plants, communal plants, and yield in wheat crops. En: Evans, L.T., Peacock, W.J., eds. *Wheat science today and tomorrow*. Cambridge University Press, pg. 223- 247.
- Echarte, L., Luque, S., Andrade, F.H., Sadras, V.O., Cirilo, A., Otegui, M.E., Vega, C.R.C. 2000. Response of maize kernel number to plant density in Argentinean hybrid released between 1965 and 1993. *Field Crops Res.* 68, 1- 8.
- Echarte, L., Andrade, F.H., Vega, C.R.C., Tollenaar, M., 2004. Kernel number determination in Argentinean maize hybrids released between 1965 and 1993. *Crop Sci.* 44, 1654-1661.
- Echarte, L., Tollenaar, M., 2006. Kernel set in maize hybrids and their inbred lines exposed to stress. *Crop Sci.* 46, 870-878.
- Edmeades, G.O., Daynard, T.B., 1979a. The relationship between final yield and photosynthesis at flowering in individual maize plants. *Can. J. Plant Sci.* 59, 585-601.
- Edmeades, G.O., Daynard, T.B., 1979b. The development of plant- to- plant variability in maize at different planting densities. *Can. J. Plant Sci.* 59, 561- 576.
- Eliasson, L., 1975. Effect of indoleacetic acid on the abscisic acid level in stem tissue. *Physiol. Plantarum* 34, 117-120.
- Elmore, R.W., Roeth, F.W., Nelson, L.A., Shapiro, C.A., Klein, R.N., Knezevic, S.Z., Martin, A., 2001. Glyphosate- resistant soybean cultivar yields compared with sister lines. *Agron. J.* 93, 408-412.

- Falconer, D.S., 1981. Introduction to Quantitative Genetics, second ed. Longman Inc., New York.
- Fan, J.B., Oliphant, A., Shen, R., Kermani, B.G., García, F., Gunderson, K.L., Hansen, M., Steemers, F., Butler, S.L., Deloukas, P., Galver, L., Hunt, S., McBride, C., Bibikova, M., Rubano, T., Chen, J., Wickham, E., Doucet, D., Chang, W., Campbell, D., Zhang, B., Kruglyak, S., Bentley, D., Hass, J., Rigault, P., Zhou, L., Stuelpnagel, J., Chee, M.S. 2003. Highly parallel SNP Genotyping. En: Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology Volume LXVIII. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Feldmann, K.A., Marks, M.D., Christianson, M.L., Quatrano, R.S., 1989. A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T- DNA insertion mutagenesis. *Science* 243, 1351-1354.
- Fleming, A.A., Kozelnicky, G.M., Browne, E.B., 1964. Variations between stocks within long- time inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 4, 291-295.
- Flores, F.; Parodi, B. 2011. Maíces Bt: manejo de la Resistencia de los insectos blanco y nuevos eventos disponibles. Informe EEA INTA Marcos Juárez.
- Ge, L., Chen, H., Jiang, J., Zhao, Y., Xu, M., Xu, Y., Tan, K., Xu, Z., Chong, K., 2004. Overexpression of OsRAA1 causes pleiotropic phenotypes in transgenic rice plants, including altered leaf, flower, and root development and root response to gravity. *Plant Physiol.* 135, 1502-1513.
- GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).
- Hall, A. 1984. Tolerancia a stress hídrico en maíz: bases fisiológicas y morfológicas. En: Asociación Ings. Agrs. Norte de la Provincia de Buenos Aires eds. Acatas III congreso Nacional de Maíz, conferencias, pg. 11- 23.
- Hall, A.; Lemcoff, J.; Trápani, N. 1981. Water stress before and during flowering in maize and its effects on yield, its components, and their determinants. *Maydica.* 26, 19-38
- Hedrick, P. 2000. Measures of genetic variation. En *Genetics of populations.* 4ta Ed. Ed. Arizona State University, Tempe, Arizona. pg. 65-81.
- Hernández, M., Pla, M., Esteve, T., S., P., Puigdomènech, P., Ferryo, A., 2003. A specific real- time quantitative PCR detection system for the event MON810 in Maize YieldGard® based on the 3'- transgene integration sequence. *Transgenic Research* 12, 179- 189.
- Higgs, R.L., Russell, W.A., 1968. Genetic Variation in Quantitative Characters in Maize Inbred Lines, I. Variation Among and Within Corn Belt Seed Sources of Six Inbreds. *Crop Sci.* 8, 345-348.

- Holck, A., Va, M., Didierjean, L., Rudi, K., 2002. 5'nuclease PCR for quantitative event-specific detection of genetically modified Mon810 MaisGard maize. . European Food Res Technol. 214, 449- 453.
- Jandel TBLCURVE, 1992. TableCurve 3.0. Curve Fitting Software., Jandel Scientific, Corte Madera, CA.
- Kiniry, J.R. y Ritchie, J.T. 1985. Shade- sensitive interval of kernel Lumber in maize. Agron. J. 77, 711- 715
- Kiniry, J.R., Jones, C.A., O'Toole, J.C., Blanchet, R., Cabelguenne, M., Spanel, D.A., 1989. Radiation-use efficiency in biomass accumulation prior to grain-filling for five grain-crop species. Field Crops Res. 20, 51-64.
- Kira, T., Ogawa, H., Shinozaki, K. 1953. Intraspecific competition among higher plants. I. Competition density yield interrelationships in regulary dispersed populations. J. Inst. Polytech. 4, 1- 16.
- Koyama, H., Kira, T. 1956. Intraspecific competition among higer plants. VII. Frequency distribution of individual plant weight as affected by the interaction between plants. J. Inst. Polytech. 7, 73- 94.
- Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. Plant Cell 11, 2283- 2290.
- Levine, E.B., 2004. Corn event MON810 and compositions and methods for detection thereof. In: US 6, 259 B2 (Ed.), USA.
- Lia V.V., Poggio, L., Confalonieri, V.A. 2009. Microsatellite variation in maize landraces from northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. Theor. Appl. Genet. 119, 1053-1067.
- Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J.S., Buckler, E., Doebley, J., 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics 165, 2117-2128.
- Loomis, R.S., Connor, D.J. 1992. Crop ecology: productivity and management in agricultural systems. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ma, B.L., Subedi, K.D., 2005. Development, yield, grain moisture and nitrogen uptake of Bt corn hybrids and their conventional near-isolines. Field Crops Res. 93, 199-211.
- Maddoni, G.A., 2012. Analysis of the climatic constraints to maize production in the current agricultural region of Argentina- a probabilistic approach. Theor. Appl. Climatol. 107, 325-345.
- Maddoni, G.A., Cirilo, A., Otegui, M.E. 2006. Row width and maize grain yield. Agron. J. 98, 1532- 1543.

- Maddonni, G.A., Iglesias Pérez, M.E., Cárcova, J., Ghersa, C.M., 1999. Flowering dynamic of maize hybrids grown in soils with contrasting agricultural history. *Maydica* 44, 141-147.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2004. Intra-specific competition in maize: early establishment of hierarchies among plants affects final kernel set. *Field Crops Res.* 85, 1-13.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2006. Intra-specific competition in maize: contribution of extreme plant hierarchies to grain yield, grain yield components and kernel composition. *Field Crops Res.* 97, 155-166.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., Andrieu, B., Chelle, M., Casal, J.J. 2002. Maize leaves turn away from neighbors. *Plant Physiol.* 130, 1181- 1189.
- Maddonni, G.A., Otegui, M.E., Cirilo, A.G., 2001. Plant population density, row spacing and hybrid effects on maize canopy architecture and light attenuation. *Field Crops Res.* 71, 183-193.
- Mayer, L.I., Rossini, M.A., Maddonni, G.A., 2012. Inter-plant variation of grain yield components and kernel composition of maize crops grown under contrasting nitrogen supply. *Field Crops Res.* 125, 98-108.
- McLachlan, S.M., Tollenaar, M., Swanton, C.J., Weise, S.F. 1993. Effect of corn- induced shading on dry matter accumulation, distribution and architecture of red root pigweed (*Amaranthus retroflexus*). *Weed Sci.* 41, 568- 573.
- Mella, R., Nider, F., Sanguinetti, A. 1984a. Componentes del rendimiento en híbridos de maíz, Argentina 1949- 1984. En: *Actas III Congreso Nacional de Maíz*. AIANBA, Pergamino. pg 30- 36.
- Mella, R., Nider, F., Sanguinetti, A. 1984b. Evaluación de la ganancia genética en el rendimiento, prolificidad y quebrado del tallo en veintidos cultivares comerciales de maíz (1949- 84). En: *Actas III Congreso Nacional de Maíz*. AIANBA, Pergamino. pg 42- 47.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease- resistance genes by bulked segregant análisis: a rapid method to detedct markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9828- 9832.
- Mousedale, D.M., Coggins, J.R., 1984. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntase from seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* 160, 78- 83.
- Naranjo, SE., 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *CAB Rev Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutrit. Nat. Resour.* 4, 1-11.

- Norsworthy, J.K., Frederick, J.R., 2005. Integrated weed management strategies for maize (*Zea mays*) production on the southeastern coastal plains of North America. *Crop Prot.* 24, 119-126.
- Otegui, M.E. 1995. Prolificacy and grain yield components in modern argentinian maize hybrids. *Maydica* 40, 371- 376.
- Otegui, M.E., Andrade, F.H., Suero, E.E., 1995. Growth, water use, and kernel abortion of maize subjected to drought at silking. *Field Crops Res.* 40, 87-94.
- Otegui, M.E., Bonhomme, R., 1998. Grain yield components in maize. I. Ear growth and kernel set. *Field Crops Res.* 56, 247-256.
- Otegui, M.E., Melon, N.S., 1997. Kernel set and flower synchrony within the ear of maize: I. Sowing date effects. *Crop Sci.* 37, 441-447.
- Padilla, J.M., Otegui, M.E. 2005. Co- ordination between leaf initiation and leaf appearance in field- grown maize (*Zea mays*): genotypic differences in response of rates to temperature. *Ann Bot– London* 96, 997-1007.
- Pagano, E., Cela, S., Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2007. Intra-specific competition in maize: ear development, flowering dynamics and kernel set of early-established plant hierarchies. *Field Crops Res.* 102, 198-209.
- Pagano, E., Maddonni, G.A., 2007. Intra-specific competition in maize: early established hierarchies differ in plant growth and biomass partitioning to the ear around silking. *Field Crops Res.* 101, 306-320.
- Pilate, G., Sossountzov, L., Miginiac, E., 1989. Hormone levels and apical dominance in the aquatic fern *Marsilea drummondii* A. Br. *Plant Physiol.* 90, 907-912.
- Pommel, B., Bonhomme, R. 1998. Variations in the vegetative and reproductive systems in individual plants of an heterogeneous maize crop. *Eur. J. Agron.* 8, 39-49.
- Pommel, B., Sohbi, Y., Andrieu, B., 2001. Use of virtual 3D maize canopies to asses the effect of plot heterogeneity on radiation interception. *Agric. Forest Meteorol.* 110, 55- 67.
- Potter, K.N., Williams, J.R., 1994. Predicting daily mean soil temperatures in the EPIC simulation model. *Agron. J.* 86, 1006-1011.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 94-100.
- Rajcan, I., Swanton, C.J., 2001. Understanding maize–weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. *Field Crops Res.* 71, 139-150.

- Rattalino Edreira, J.I., Budakli Carpici, E., Sammarro, D., Otegui, M.E., 2011. Heat stress effects around flowering on kernel set of temperate and tropical maize hybrids. *Field Crops Res.* 123, 62-73.
- Ritchie, J.T., NeSmith, D.S., 1991. Temperature and crop development. En: Hanks, J., Ritchie, J.T. Eds., *Modelling Plant and Soil Systems. Agronomy Series*, vol. 31. American Society of Agriculture, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 5-29.
- Ritchie, S.W., Hanway, J.J. 1982. How a corn plant develops. Iowa State Univ. Special Report 48.
- Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O., 1993. How a corn plant develops. Iowa State Univ. Special Report 48.
- Rosati, A., Bogani, P., Santarlasci, A. 2008. Characterisation of 3' transgene site and derived mRNAs in MON810 YieldGard® maize. *Plant Mol. Biol.* 67, 271-281.
- Rossi, D. 2007. Evolución de los cultivares de maíz utilizados en la Argentina <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/22/1AM22.htm>
- Rossini, M.A., Maddonni, G.A., Otegui, M.E., 2011. Inter-plant competition for resources in maize crops grown under contrasting nitrogen supply and density: Variability in plant and ear growth. *Field Crops Res.* 121, 373-380.
- Rozen S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S Eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Russell, W.A., Thimann, K.V., 1988. The second messenger in apical dominance controlled by auxin, En: Pharis, R.P., Rood, S.B. Eds. *Plant growth substances*. Springer-Varlag, New York, pp. 419- 427.
- Satorre, E. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia hoy* 15, 24- 31.
- Scott, M.P.; Pollak, L.M. 2005. Transgenic maize. *Starch/ Stärke* 57, 187- 195.
- Shagai-Marooof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer- length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations, and populations dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 8014- 8018.
- Sinclair, T.R., Horie, T., 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop Sci.* 29, 90-98.
- Smith, H., Whitlam, G.C. 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20, 840- 844.
- Stam, P., Zeven, A.S. 1981. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self- fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica* 30, 227- 238.

- Stanger, T.F., Lauer, J.G., 2006. Optimum plant population of Bt and non-Bt corn in Wisconsin. *Agron. J.* 98, 914-921.
- STATISTIX, 2000. Statistix 7, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA.
- Subedi, K.D., Ma, B.L., 2007. Dry matter and nitrogen partitioning patterns in Bt and non-Bt near-isoline maize hybrids. *Crop Sci.* 47, 1186-1192.
- Tanksley, S., Nelson, J., 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92, 191-203.
- Tardieu, F., Reymond, M., Muller, B., Granier, C., Simonneau, T., Sadok, W., Welcker, C., 2005. Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Australian journal of Agricultural Research* 56, 937- 946.
- Thimann, K.V., Skoog, F., 1934. On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia Faba*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 114, 317-339.
- Tollenaar, M., Daynard, T.B., Hunter, R.B., 1979. Effect of temperature on rate of leaf appearance and flowering date in maize. *Crop Sci.* 19, 363-366.
- Tollenaar, M., Lee, E.A. 2002. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *Field Crops Res.* 75, 161- 169.
- Tollenaar, M., Wu, J., 1999. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. *Crop Sci.* 39, 1597-1604.
- Traore, S.B., Carlson, R.E., Pilcher, C.D., Rice, M.E., 2000. Bt and Non-Bt maize growth and development as affected by temperature and drought stress. *Agron. J.* 92, 1027- 1035.
- Trewavas, A., 1981. How do plant growth substances work? *Plant Cell Environ.* 4, 203-228.
- Uhart, S.A., Andrade, F.H. 1995. Nitrogen deficiency in maize: I. Effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. *Crop Sci.* 35, 1376- 1383.
- Vega, C.R.C., Andrade, F.H., Sadras, V.O., 2001a. Reproductive partitioning and seed set efficiency in soybean, sunflower and maize. *Field Crops Res.* 72, 163-175.
- Vega, C.R.C., Andrade, F.H., Sadras, V.O., Uhart, S.A., Valentinuz, O.R., 2001b. Seed number as a function of growth. A comparative study in soybean, sunflower, and maize. *Crop Sci.* 41, 748-754.
- Vega, C.R.C., Sadras, V.O., 2003. Size-Dependent growth and the development of inequality in maize, sunflower and soybean. *Ann Bot– London.* 91, 795-805.

- Wang, F., Ye, C., Zhu, L., Nie, L., Cui, K., Peng, S., Lin, Y., Huang, J., 2012. Yield differences between Bt transgenic rice lines and their non- Bt counterparts, and its possible mechanism. *Field Crops Res.* 126, 8-15.
- Wang, Y., Jones, J.D., Weller, S.C., Goldsbrough, P.B., 1991. Expression and stability of amplified genes encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate tolerant tobacco cells. *Plant Molecular Biology* 17, 1127- 1138.
- Weiner, J. 1986. How competition for light and nutrients affects size in *Ipomoea tricolor* populations. *Ecology* 67, 1425- 1427.
- Wiatrak, P.J., Wright, D.L., Marois, J.J., Sprengel, R., 2004. Corn hybrids for late planting in the southeast. *Agron. J.* 96, 1118-1124.
- Williams, W.P., Sagers, J.B., Hanten, J.A., Davis, F.M., Buckley, P.M., 1997. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. *Crop Sci.* 37, 957-962.
- Young, N.D., Tanksley, S.D. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77, 353- 359.
- Yu. H.L., Li, Y.H., Wu, K.M., 2011. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. *J. Integr. Plant. Biol.* 53, 520-538.