



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación de grupos heteróticos en líneas endogámicas de maíz tropical mediante cruzamientos dialélicos y marcadores SNP

Laura Marcela Torres González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Palmira, Colombia

2022

Determinación de grupos heteróticos en líneas endogámicas de maíz tropical mediante cruzamientos dialélicos y marcadores SNP

Laura Marcela Torres González

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magíster en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D., María Isabel Chacón Sánchez
Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Ph. D., Víctor Manuel Mayor Duran
Semillas Valle S.A.

Línea de Investigación:

Genética y Fitomejoramiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Palmira, Colombia

2022

Dedicatoria:

A mi familia.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Laura Marcela Torres González

Fecha

01/02/2023

Agradecimientos

A mis padres Erika González y Freddy Torres, por el apoyo incondicional y su impulso para ser mejor persona y profesional cada día, y gracias a toda mi familia por estar siempre orgullosos de mis pequeños logros. A mi novio José Miguel Sarmiento, por la compañía y la paciencia en cada paso, y sus ganas de ayudarme siempre.

A mis directores de tesis, la Doctora María Isabel Chacón y el Doctor Víctor Manuel Mayor, por su buena disposición y confianza, y todos sus aportes y conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Doctor José Joaquín Marulanda y la Doctora Anna Camila Nader, por sus aportes en mi proceso de formación, sus consejos y disposición para enseñar, y especialmente por su amistad.

A mis amigos Christian Pimentel y Tatiana García, por su ayuda, sus consejos y su paciencia en mi proceso de aprendizaje.

A la compañía Semillas Valle S.A. por permitirme desarrollar este trabajo y hacer un aporte a su programa de mejoramiento, y a todo el equipo de investigación de la compañía quienes siempre tuvieron su mejor actitud para obtener los mejores resultados

Resumen

Determinación de grupos heteróticos en líneas endogámicas de maíz tropical mediante cruzamientos dialélicos y marcadores SNP.

Uno de los objetivos principales de los programas de mejoramiento genético de maíz es desarrollar líneas parentales endocriadas de alto valor genético que al ser cruzadas puedan producir híbridos con características agronómicas superiores. En Colombia, la obtención de este tipo de híbridos es de alto interés ya que pueden ayudar a aumentar el rendimiento y la producción de maíz y cerrar la brecha que existe entre la producción nacional y la importación de maíz que actualmente es del 74%. Actualmente el programa de mejoramiento genético de maíz de Semillas Valle no cuenta con una caracterización del germoplasma que le permita establecer estrategias eficientes para la obtención de híbridos de alto rendimiento. En el presente estudio se llevó a cabo la clasificación de líneas endocriadas en grupos heteróticos a partir de datos genómicos empleando marcadores moleculares tipo SNP y variables fenotípicas en 66 líneas del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A., y a partir de datos de campo de un ensayo de tipo dialelo donde participaron 30 parentales. A partir de un análisis de clúster de los datos SNPs se identificaron tres grupos heteróticos o subpoblaciones. Por otra parte, los resultados del dialelo permitieron clasificar las líneas en dos grupos heteróticos basados en los efectos de la habilidad combinatoria específica (HCE), y en tres grupos basados en la habilidad combinatoria general para múltiples rasgos (HGCAMT). Sin embargo, la integración de las metodologías podría proveer más información respecto a los grupos heteróticos presentes en la población evaluada.

Palabras clave: grupos heteróticos, maíz tropical, dialelo, habilidad combinatoria específica, SNP, análisis de clúster.

Abstract

Heterotic grouping of tropical maize inbred lines using Diallel crosses and SNP markers

One of the main objectives on the maize breeding programs is the development of parental inbred lines of high genetic value, which crossings could produce new hybrids with improved agronomic characteristics. In Colombia, obtaining this kind of hybrids is highly interesting because it can help to obtain better yielding and improve the maize production, to close the gap between the national production and the maize imports, which currently represents the 74% of the internal consume. Currently, the Semillas Valle maize breeding program does not have with the characterization of the germplasm to be used in the establishment efficient strategies for the high yielding hybrids. In this study, we are going to evaluate the classification of inbred lines into heterotic groups using SNP molecular markers, and field data of 66 lines from the Semillas Valle S.A. maize breeding program, and from field data of a diallel crossing essay where 30 parental lines participate. From a cluster analysis of the SNPs data, we identify three heterotic groups or subpopulations. In the other hand, diallel results allows us to infer three different groups. Nevertheless, the integration of both methodologies could provide additional information about the heterotic groups present in the population.

Keywords: heterotic groups, tropical maize, diallel, specific combining ability, SNP, cluster analysis.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	XI
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	21
1. Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.	25
1. Resumen	25
1.1 Introducción.....	26
1.2 Materiales y métodos	28
1.2.1 Selección de parentales y formación de híbridos	28
1.2.2 Evaluación de híbridos.....	29
1.2.3 Análisis de datos	31
1.2.4 Clasificación de líneas en grupos heteróticos.....	33
1.3 Resultados	34
1.4 Discusión	46
1.5 Conclusiones.....	51
2. Capítulo 2: Estructura genética y determinación de grupos heteróticos de líneas endocriadas de maíz de origen tropical a partir de marcadores tipo SNP.....	53
2.1 Resumen.....	53
2.2 Introducción.....	54
2.3 Metodología	56
2.3.1 Secuenciación de las líneas parentales.....	56
2.3.2 Análisis de diversidad genética	57
2.3.3 Caracterización fenotípica de líneas endocriadas	58
2.3.4 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS) para variables fenotípicas	59
2.4 Resultados	60
2.4.1 Marcadores tipo SNP y análisis de estructura poblacional.	60

Límite superior por encima de la diagonal. Límite inferior por debajo de la diagonal.	65
H_s = diversidad genética promedio; H_o = heterocigosidad observada; F_{IS} = índice de fijación.	65
2.4.2 Análisis de varianza y componentes principales.....	66
2.4.3 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS).....	68
2.5 Discusión	71
2.6 Conclusiones.....	74
3. Capítulo 3: Comparación de las metodologías de clasificación de los patrones heteróticos: Dialelo y SNPs.....	75
3.1 Resumen.....	75
3.2 Introducción.....	76
3.3 Metodología	77
3.3.1 Determinación de grupos heteróticos a partir de ensayos tipo dialelo	77
3.3.2 Determinación de grupos heteróticos a partir de marcadores moleculares	79
3.3.3 Comparación de las metodologías evaluadas	80
3.4 Resultados	80
3.4.1 Determinación de grupos heteróticos a partir de la habilidad combinatoria específica.....	80
3.4.2 Determinación de grupos heteróticos a partir de marcadores tipo SNP y análisis de estructura poblacional.....	81
3.4.3 Comparación de los grupos heteróticos establecidos mediante las dos metodologías evaluadas.....	87
3.5 Discusión	90
3.6 Conclusiones.....	95
4. Conclusiones y recomendaciones.....	96
4.1 Conclusiones.....	96
4.2 Recomendaciones.....	97
Anexos.....	99
A. Anexo 1: Estimación de Habilidad Combinatoria Específica en el rasgo de rendimiento para 435 híbridos y 30 líneas endogámicas de Maíz tropical.....	99
Referencias Bibliográficas	107

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Correlaciones fenotípicas para el rendimiento de grano y otros caracteres evaluados en híbridos de maíz de origen tropical en un ensayo de tipo dialelo con 30 parentales involucrados. Florm= floración masculina; Florf= floración femenina; Alpa= altura de planta; Almaz=altura de mazorca; Numplanvolc=número de plantas volcadas en la parcela; Nummazenf= número de mazorcas enfermas; Asmaz= aspecto de mazorca; Pdesgra= perso de grano; Porcgrano= porcentaje de grano; Porchumed= porcentaje de humedad de grano; Rendim= rendimiento de grano.	39
Figura 1-2. Estimación de la habilidad combinatoria especifica (HCE) en la variable rendimiento para 30 líneas endocriadas de maíz de origen tropical Tendencia de color: Rojo valores negativos, amarillo valores cercanos a 0 y verde valores positivos.....	41
Figura 1-3 Dendograma de 30 líneas de maíz de origen tropical construido a partir de los efectos de la HCG del rendimiento de grano y otros rasgos usando el análisis de clúster de mínima varianza de Ward. Los puntos de colores hacen referencia al origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.	45
Figura 2-1. Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al color de grano de los genotipos de acuerdo con la caracterización fenotípica.....	62
Figura 2-2 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al origen de los genotipos de acuerdo con la información del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A.	63
Figura 2-3 Delta K (Δ) para diferente número de subpoblaciones (K).....	63
Figura 2-4 Estructura poblacional estimada de 82 líneas endocriadas de maíz tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. Diferentes colores indican la agrupación en una subpoblación diferente.	64
Figura 2-5 Árbol filogenético de unión de vecinos no enraizado basado en la matriz de distancias genéticas, representando las tres subpoblaciones determinadas a partir de STRUCTURE para un grupo de 82 líneas endocriadas de maíz tropical.	66
Figura 2-6. Gráficas MDS para las variables fenotípicas evaluadas. a) Días a liberación de polen al 50%, b) Días a estigmas visibles al 50%, c) Altura de planta, d) Altura de mazorca, e) Longitud de mazorca, f) Diámetro de tuza, g) Número de hileras por	

mazorca, h) Número de granos por hilera. Colores más oscuros indican valores inferiores y colores más claros valores superiores.	69
Figura 2-7 Gráficas MDS para las variables fenotípicas evaluadas: a) ancho de hoja, b) Longitud de espiga, c) Color de grano, donde: 0= blanco, 1= naranja, 2= naranja claro, 3= amarillo, 4= amarillo claro; d) Tipo de grano, donde: 0= cristalino, 1= semicristalino, 2= intermedio, 3= semiharinoso, 4= harinoso; e) Peso de 100 semillas o índice se semilla. 70	
Figura 3-1 Dendrograma de 30 líneas de maíz de origen tropical construido a partir de los efectos de la HCG del rendimiento de grano y otros rasgos usando el análisis de clúster de mínima varianza de Ward. Los puntos de colores hacen referencia al origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.	81
Figura 3-2 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al color de grano de los genotipos de acuerdo con la caracterización fenotípica.....	82
Figura 3-3 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al origen de grano de los genotipos de acuerdo con la información del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A.	83

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Variables fenotípicas cuantificadas y calculadas en cada ensayo.	30
Tabla 1-2 Cuadrados medios para las variables registradas de rendimiento de grano, peso de mazorcas, peso de grano, hileras, altura de mazorca (cm), altura de planta (cm).	34
Tabla 1-3. Cuadrados medios para las variables registradas: aspecto de mazorca, color de grano, tipo de grano, días a floración masculina, días a floración femenina.	35
Tabla 1-4. Cuadrados medios para las variables registradas Turcicum, Cercospora, Roya y enfermedades foliares prefloración (Enfol).	35
Tabla 1-5 Componentes principales para 12 características en híbridos de maíz para el rendimiento de grano y otros caracteres evaluados en híbridos de maíz de origen tropical en un ensayo de tipo dialelo con 30 parentales involucrados.	36
Tabla 1-6. Estimación de Habilidad Combinatoria General en ocho características fenotípicas para 30 líneas endogámicas de Maíz tropical.....	40
Tabla 1-7 Estimación de varianzas y heredabilidades en cruzamientos dialélicos de líneas maíz de origen tropical.	42
Tabla 1-8. Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria específica de sus cruzamientos.....	43
Tabla 1-9. Clasificación de grupos heteróticos por color de grano, para 15 líneas de maíz blanco y 15 líneas de maíz amarillo de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria específica de sus cruzamientos.....	44
Tabla 2-1 Características fenotípicas evaluadas en las 82 líneas endocriadas de maíz de origen tropical.....	58
Tabla 2-2 Resultados de STRUCTURE para la proporción de genotipos inferidos en cada clúster, Heterocigosidad esperada (H_e) y número de genotipos asignados para cada población.....	64
Tabla 2-3 Valores promedio de F_{ST1} , F_{ST2} , F_{ST3} inferidos de la aproximación basada en el modelo.	64
Tabla 2-4 Divergencia de frecuencia alélica entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.	65
Tabla 2-5 Intervalos de confianza superior e inferior para los F_{ST} calculados entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.	65
Tabla 2-6 Diversidad genética promedio, heterocigosidad observada e índice de fijación para las subpoblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.	65

Tabla 2-7 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas DLP50, DEV50, Alpla, Almaz, AnchoHoja, LongEspiga y Diamtuza.....	67
Tabla 2-8 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas Diammaz, Longmaz, No. Hileras, Granos/hilera, Tipogr, Color gr y Peso100sem	67
Tabla 2-9 Componentes principales para 14 características fenotípicas en 66 líneas de maíz de origen tropical clasificadas en 3 subpoblaciones a partir de SNPs.	68
Tabla 3-1 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas DLP50, DEV50, Alpla, Almaz, AnchoHoja, LongEspiga y Diamtuza.....	84
Tabla 3-2 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas Diammaz, Longmaz, No. Hileras, Granos/hilera, Tipogr, Color gr y Peso100sem	84
Tabla 3-3 Resultados de STRUCTURE para la proporción de genotipos inferidos en cada clúster, Heterocigosidad esperada (He) y número de genotipos asignados para cada población.....	86
Tabla 3-4 Valores promedio de Fst1, Fst2 y alfa inferidos de la aproximación basada en el modelo.....	86
Tabla 3-5 Divergencia de frecuencia alélica entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.	86
Tabla 3-6 Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir del análisis de estructura poblacional	86
Tabla 3-7 Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria de sus cruzamientos y el análisis de estructura poblacional a partir de SNPs	87
Tabla 3-8 Costos para el desarrollo de un ensayo tipo dialelo y genotipificación por SNPs para 30 líneas de maíz de origen tropical	89
Tabla 3-9 Esquema de tiempo para el desarrollo de un ensayo tipo dialelo y genotipificación por SNPs para 30 líneas de maíz de origen tropical.....	89

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo
--------	--

HCE	Habilidad combinatoria específica
-----	-----------------------------------

HCG	Habilidad combinatoria general
-----	--------------------------------

HGCAMT	Habilidad combinatoria general para múltiples rasgos
--------	--

MDS	Análisis de escalamiento multidimensional
-----	---

PCA	Análisis de componentes principales
-----	-------------------------------------

SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (Single nucleotide polimorfism).
-----	--

Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

Introducción

En Colombia, el maíz (*Zea mays* L.) es el tercer cultivo con mayor superficie de siembra después del café y el arroz. La producción de maíz en Colombia aumentó en las últimas décadas presentando un incremento de 76% entre 1961 y 2016. A pesar de ello, es el país con mayor volumen de importaciones en Suramérica y el séptimo en el mundo, cubriendo alrededor del 74% de la demanda interna de maíz con importaciones (Govaerts et al., 2019). El cultivo de maíz en Colombia se desarrolla en dos tipos de sistemas productivos que corresponden al sistema productivo tradicional y tecnificado. La diferencia radica en que en el sistema tradicional no se usan semillas híbridas ni sistemas de irrigación, y la aplicación de fertilizantes está restringida al uso de nitrógeno con dosis de hasta 40 kg/ha, y se desarrollan en áreas inferiores a 5 hectáreas (Salgar, 2004; Viveros Barrera, 2016). En contraste, el 84.5% del sistema tecnificado ha adoptado el uso de semilla híbrida, y se caracteriza por la implementación de maquinaria agrícola y grandes volúmenes de fertilización, así como por desarrollarse en áreas superiores a las 5 hectáreas (Fondo Nacional Cerealista & FENALCE, 2011; Govaerts et al., 2019; Salgar, 2004). El primer sistema tiene un rendimiento promedio de 2 t*ha⁻¹, mientras para el segundo es de 5.4 t/ha. De acuerdo con algunas experiencias en el CIMMYT, los híbridos mejorados pueden alcanzar rendimientos entre 37 y 105% más en relación con las variedades regionales (Govaerts et al., 2019) y en el Valle del Cauca se han alcanzado rendimientos de hasta 8.5 t/ha (UGRA, 2018). Así, con el objetivo de aumentar la producción de maíz en Colombia, los híbridos representan el estándar que se quiere alcanzar en términos de producción y calidad. Alcanzar este estándar implica un proceso de mejoramiento genético para la generación de líneas parentales, formación de híbridos experimentales, su evaluación a través de diferentes ambientes y la selección de los mejores híbridos (Govaerts et al., 2019).

El principal objetivo de los programas de mejoramiento genético de maíz es desarrollar líneas endocriadas, producto de seis a ocho ciclos sucesivos de autopolinizaciones, de

alto valor genético que tengan buena habilidad combinatoria, de forma tal que al ser cruzadas por otras líneas endocriadas generen híbridos de alto rendimiento y excelente comportamiento agronómico (Ricci et al., 2007; Tollenaar et al., 2004). El desarrollo de híbridos de maíz parte del mejoramiento sistemático de una población por selección recurrente y la explotación del principio de heterosis que se presenta en algunas especies simultáneamente (Labroo et al., 2021). La heterosis, o vigor híbrido, hace referencia a un fenómeno en el que la progenie de un cruzamiento entre líneas endocriadas muestra un comportamiento superior al de los parentales, exhibiendo mayor biomasa, crecimiento y desarrollo más rápidos y mejor rendimiento, entre otros (Birchler et al., 2003; Ricci et al., 2007).

La definición de grupos o patrones heteróticos es fundamental en el mejoramiento de maíz híbrido, ya que en programas con gran cantidad de líneas parentales se evita la evaluación de cruzamientos que no van a presentar resultados positivos (Barata & Carena, 2006; Mahato et al., 2021; Singh & Gupta, 2019; van Inghelandt et al., 2010). De acuerdo con Maruthi (2019), los grupos heteróticos se definen como grupos de genotipos que pueden o no estar relacionados entre ellos, que se caracterizan por presentar una respuesta heterótica cuando son cruzados por grupos de genotipos genéticamente distintos. Existen diferentes metodologías para clasificar los grupos heteróticos en maíz, tales como la evaluación de la habilidad combinatoria específica (HCE) para el rendimiento de grano; el efecto de la habilidad combinatoria general en múltiples rasgos; la habilidad combinatoria general y específica para el rendimiento, y las distancias genéticas basadas en SNPs (Oyetunde et al., 2020).

Los cruzamientos dialélicos se usan para estimar los efectos genéticos de las poblaciones de mejoramiento. De acuerdo con Griffing (1956a), los cruzamientos dialélicos son un sistema en el cual un número determinado de líneas es seleccionado para realizar cruzamientos entre ellas, formando todas las combinaciones posibles, con el fin de clasificar las líneas endocriadas en grupos heteróticos, de acuerdo con su comportamiento agronómico y rendimiento en campo. Esta es una de las técnicas de biometría más usadas y ha sido empleada por varios investigadores para definir patrones heteróticos en maíz (Christie & Shattuck, 2010; El-Badawy, 2013; Murtadha et al., 2018; Reif et al., 2003; Wang et al., 2020).

Por otra parte, el uso de marcadores moleculares ha mostrado ser útil en la clasificación de líneas endocriadas en grupos heteróticos ya que permite evaluar la diversidad genética al nivel del ADN. Los análisis basados en marcadores moleculares pueden constituir una herramienta confiable y efectiva para evaluar la diversidad dentro de diferentes poblaciones de maíz y compararlas entre ellas. Una de las ventajas de estos análisis es la gran cantidad de marcadores genéticos evaluados, lo cual puede facilitar la interpretación de los resultados y la inferencia de la estructura poblacional (Adu et al., 2019).

El análisis de escalamiento multidimensional (MDS) es una técnica que permite establecer las relaciones fenotípicas en el germoplasma evaluado a partir de la matriz de distancias genéticas (A. R. da Silva et al., 2014, Reif et al., 2003), Reif et al., 2003). Hasta ahora, las repeticiones de secuencias cortas (SSR, por sus siglas en inglés) han sido los marcadores más usados en la determinación de grupos heteróticos en maíz (Aguiar et al., 2008; Barata & Carena, 2006; Maruthi, 2019; van Inghelandt et al., 2010). Hoy en día los polimorfismos de nucleótido simple o SNPs (por sus siglas en inglés), se han convertido en una elección común ya que ocurren en una frecuencia mucho más alta en el genoma que los SSR. El chip de Illumina MaizeSNP50, consiste en 56,110 SNPs (Q. Li et al., 2012) y ha demostrado ser eficiente para realizar análisis de estructura poblacional y diversidad genética, y para la resolución de grupos heteróticos. Este arreglo contiene numerosos SNPs directamente relacionados con rasgos agronómicos de importancia, lo que lo hace muy útil en la evaluación de germoplasma, mapeo genético y mejoramiento (Q. Li et al., 2012; N. Liu et al., 2016).

Aunque la clasificación de grupos heteróticos es igualmente posible a partir de datos fenotípicos en ensayos de tipo dialélico, o a partir de información genética, en nuestro contexto no se ha determinado cuál metodología es más eficiente en la clasificación de líneas endocriadas en grupos heteróticos en términos de tiempo y recursos necesarios. Es posible que el uso complementario del análisis de habilidad combinatoria y el uso de marcadores moleculares permita realizar comparaciones directas de la similitud genética entre las líneas (Barata & Carena, 2006; Mahato et al., 2021; Maruthi, 2019). El éxito de un programa de mejoramiento depende en gran medida de la eficiencia de los procedimientos usados en la determinación de las líneas que deben ser cruzadas, para

producir híbridos sobresalientes (Pinto et al., 2003). Por tanto, es necesario establecer estrategias eficientes para la asignación de genotipos en grupos heteróticos, haciendo posible la clasificación de líneas endocriadas desarrolladas en el programa de forma rápida y precisa con el fin de evitar la formación y evaluación de cruzamientos que posiblemente serán descartados, permitiendo explotar el germoplasma y la heterosis presente en el mismo.

El objetivo del presente estudio fue clasificar 66 líneas élite de maíz de origen tropical del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A. en grupos heteróticos, mediante marcadores moleculares tipo SNP y variables fenotípicas. Este estudio constituye una contribución importante en el desarrollo de prácticas eficientes y metodologías de mejoramiento en el programa de Semillas Valle S.A., permitiendo la generación de híbridos de alto rendimiento y características agronómicas deseables, desarrollados en las condiciones del Valle del Cauca, incentivando las siembras de maíz tanto en el departamento como en el país, al generar aumentos en la producción, y así beneficios para los agricultores.

1. Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

1.1 Resumen

Los cruzamientos dialélicos han permitido la determinación de la habilidad combinatoria general (HCG) y la habilidad combinatoria específica (HCE), así como la determinación de grupos heteróticos, lo cual es de gran importancia en programas de mejoramiento genético para la producción de híbridos. El estudio se llevó a cabo en los dos semestres del año 2018, en dos localidades del Valle del Cauca con el objetivo de clasificar 30 líneas de maíz de origen tropical a partir de un ensayo de dialélico donde se incluyeron los parentales y las F1, sin recíprocos, comparando la aplicación de dos metodologías de clasificación: a partir de la HCE del rendimiento de grano, y en la habilidad combinatoria general para múltiples rasgos (HGCAMT). Los efectos de HCG fueron menores para los componentes de rendimiento respecto a los efectos de la HCE, sugiriendo que la acción génica no aditiva es más importante que la acción génica aditiva en el conjunto de líneas evaluado. Las líneas fueron clasificadas en dos grupos heteróticos basados en los efectos de la HCE, y en tres grupos basado en la HGCAMT. Las líneas LB10, LA13 y LA08 se identificaron como posibles probadores heteróticos de los grupos identificados, mientras que los híbridos LB04/LB33, LB22/LA03, LA14/LA06, LB15/LA08 y LB06/LA03 se identificaron como las mejores combinaciones con potencial para mercado.

Palabras clave: cruzamiento dialélico, habilidad combinatoria general, habilidad combinatoria específica, grupos heteróticos, maíz tropical.

Abstract

Diallel crosses allow the determination of the general combining ability (GCA) and the specific combining ability (SCA), as well as the determination of heterotic patterns, which have great importance in hybrid crop breeding. The present study was conducted in 2018 during two semesters, at two locations in Valle del Cauca to classify 30 tropical maize inbred lines, through a diallel cross where parentals and F1s were included, with no reciprocals. Two classification methodologies were applied: one based on the SCA of grain yield and the other one based on the GCA of multiple traits (HGCAMT). For grain yield, GCA effects were less in magnitude in relation to SCA effects, suggesting that non-additive gene action is more important than additive gene effects for this trait in the set of lines. Lines were classified in two heterotic groups based in SCA effects, and in three groups based on HGCAMT. Lines LB10, LA13 and LA08 were identified as the best candidates for testers for the heterotic groups identified, while LB04/LB33, LB22/LA03, LA14/LA06, LB15/LA08 y LB06/LA03 were identified as the best hybrids for potential commercialization.

Key words: diallel cross, general combining ability, specific combining ability, heterotic groups, tropical maize.

1.2 Introducción

Algunos métodos experimentales de comparaciones directas entre progenies desarrolladas mediante cruzamientos y endocria permitieron realizar observaciones en donde usualmente los cruzamientos presentaban mayor vigor y productividad, particularmente aquellos que se producían luego de algún nivel de endocria de los parentales, lo cual se nombró como heterosis (Hallauer, 2015). El fenómeno de heterosis fue definido por Shull (1952) (citado por Hallauer (2015) y Meena et al. (2017)) como: “La interpretación del incremento del vigor híbrido, tamaño, fructificación, velocidad de crecimiento, resistencia a enfermedades e insectos plaga, o condiciones climáticas de cualquier tipo, manifestada por organismos producto de un cruzamiento comparados con

sus correspondientes endocrias”, es decir, la diferencia entre un híbrido y sus parentales (Meena et al., 2017). La heterosis es una de las bases del mejoramiento genético de cultivos con polinización cruzada como el maíz (Hallauer, 2015).

El concepto de cruzamiento dialélico como la recombinación de la variabilidad genética en un programa de mejoramiento, realizando cruzamientos entre todas las líneas endocriadas presentes, fue propuesto por Sprague & Tatum (1942) y Griffing, (1956), (citados por (Nardino et al., 2016)), estableciendo que n líneas van a resultar en n^2 cruzamientos. Los cruzamientos dialélicos permiten estimar los parámetros genéticos útiles en la selección de parentales para la construcción de híbridos, además de la identificación de las mejores combinaciones de parentales para ser usados como hembras o machos de acuerdo con la mayor expresión de heterosis observada (Nardino et al., 2016). En maíz, existen gran cantidad de grupos heteróticos en diferentes áreas geográficas, que fueron usados como el germoplasma original por los primeros mejoradores de maíz (Melchinger & Gumber, 1998). Si bien los grupos heteróticos no evolucionan naturalmente, poblaciones de diferentes orígenes pueden ser genéticamente diferentes en las frecuencias alélicas, lo que puede resultar en el fenómeno de heterosis (Hallauer, 2015). Así, el éxito del desarrollo de híbridos en maíz requiere establecer los patrones heteróticos del germoplasma con que se cuenta (Meena et al., 2017).

Varios autores han reportado el uso de ensayos de tipo dialélico, donde se han evaluado híbridos simples formados por líneas endocriadas (Bidhendi et al., 2009; El-Badawy, 2013; Paterniani et al., 2000). Estos ensayos han permitido determinar la habilidad combinatoria general (HCG) y la habilidad combinatoria específica (HCE), así como la determinación de grupos heteróticos y las mejores combinaciones, lo cual ha sido de utilidad en programas de mejoramiento genético para la producción de híbridos y variedades compuestas por híbridos que al cruzarse presentan un comportamiento favorable para los rasgos de interés (Badu-Apraku et al., 2013). La HCG es resultado de los efectos de la acción génica aditiva de los rasgos altamente heredables y corresponde a un estimativo del comportamiento promedio de un parental en sus combinaciones híbridas, mientras que la HCE es resultado principalmente de los efectos no aditivos, incluyendo la dominancia y epistasis, y es una medida de la desviación del comportamiento del híbrido respecto al comportamiento esperado a partir de la HCE de

sus progenitores (Lu et al., 2020; Reif et al., 2007; Sprague & Tatum, 1942) de sus progenitores (Lu et al., 2020; Reif et al., 2007; Sprague & Tatum, 1942).

Se han establecido diferentes aproximaciones para clasificar líneas endocriadas en grupos heteróticos con base en la habilidad combinatoria de cada parental. Usualmente, la clasificación de líneas se realiza con base en la HCE del rendimiento de grano, debido a la asunción de que la HCE entre líneas de diferentes grupos es superior a la que se presenta entre líneas del mismo grupo (Bidhendi et al., 2009; Chandel et al., 2019; Menkir et al., 2004a). Sin embargo, dado que el rendimiento es un rasgo complejo, Badu-Apraku et al. (2013) propusieron un método de clasificación basado en la habilidad combinatoria general de múltiples rasgos (HGCAMT), el cual integra la HCG de diferentes caracteres con efectos aditivos significativos en los ambientes evaluados (Badu-Apraku et al., 2013; Olutayo Akinwale, 2021).

Dada la necesidad de establecer grupos heteróticos y la utilidad de los dialelos para este fin en los programas de mejoramiento, el objetivo del presente estudio fue determinar los patrones heteróticos y la habilidad combinatoria para componentes de rendimiento de 30 líneas endocriadas de maíz de origen tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A., a partir de cruzamientos dialélicos.

1.3 Materiales y métodos

El ensayo se realizó entre los años 2016 y 2018. La formación de híbridos fue llevada a cabo entre 2016 y 2017, y posteriormente la evaluación de los híbridos se realizó en 2018.

1.3.1 Selección de parentales y formación de híbridos

En el ensayo se incluyeron 30 líneas élite del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A como parentales, 15 líneas de grano color blanco y 15 líneas de grano color amarillo. Las líneas fueron seleccionadas por ser las líneas parentales con mayor cantidad de híbridos experimentales formados desde 2013. Con ayuda de la herramienta informática Semillas (v. 2018) (Semillas Valle S.A.), se programaron cruzamientos entre los 30 parentales, sin incluir los recíprocos, de acuerdo con el método II descrito por Griffing (1956), para un total de 435 cruzamientos $[(P(P-1)) / 2]$ y los 30 parentales. La

obtención de semilla se realizó en las instalaciones del Centro Experimental Guillermo Paz Casas de Semillas Valle S.A. ubicado en el municipio de El Cerrito, Valle del Cauca. Los cruzamientos fueron formados mediante polinizaciones manuales para asegurar la integridad genética de los materiales. Para ello, las líneas hembra y macho se sembraron en una relación de 2 surcos a 1, respectivamente. Cada hembra se dispuso en campo en 2 surcos de 2 metros, separados a 0,8 m entre surcos, en grupos de 10 a 15 hembras seguidas por el macho correspondiente para la formación del híbrido. Los parentales se obtuvieron mediante autopolinizaciones manuales, en 2 surcos de 2 metros cada uno. La trazabilidad de los procesos de campo se realizó identificando cada genotipo con un código QR sobre el cual se registraron, además de la información de los cruzamientos realizados, los datos fenotípicos recolectados para cada material. La cosecha de dichos materiales se realizó de forma manual al momento de madurez fisiológica (aprox. 105 días después de siembra). La semilla fue llevada a secamiento en las celdas de secado de la planta de beneficio de semillas de Semillas Valle S.A., ubicada en el municipio de Yumbo, Valle del Cauca, hasta alcanzar el 14% de humedad. Posteriormente se seleccionó manualmente por el equipo experimentado de Semillas Valle y fue almacenada en cuarto frío a 4°C hasta la siembra para garantizar su calidad fisiológica.

1.3.2 Evaluación de híbridos.

Los 435 híbridos sencillos, y los 30 parentales, fueron evaluados junto con 4 híbridos comerciales como testigos en un diseño de bloques aumentados. Los ensayos fueron llevados a cabo en dos semestres consecutivos, 2018A y 2018B, en dos localidades que correspondían a la finca Estambul, ubicada en el norte del Valle de Cauca, en el municipio de Roldanillo (4°27'05"N 76°04'53"W), y al Centro Experimental de Semillas Valle S.A. ubicado en el centro del Valle del Cauca, en el municipio de El Cerrito (3°41'26.3"N 76°18'35.7"W). Cada unidad experimental consistió en dos surcos de 5 metros, con distanciamiento de 0.8 m entre surcos y callejones frontales y posteriores de 2 m y 0.8 m respectivamente.

En cada una de las localidades se evaluaron caracteres fenotípicos, incluyendo los componentes de rendimiento y sanidad más importantes los cuales se detallan en la tabla 1-1.

Tabla 1-1 Variables fenotípicas cuantificadas y calculadas en cada ensayo.

VARIABLE	HERRAMIENTA	DÍAS*	DESCRIPCIÓN
POBLACIÓN	Medición directa	30	Conteo de plantas en etapa de desarrollo V4 para realizar raleo y subsecuentemente en estado V6 para verificar el número de plantas establecidas por surco.
POBLAESTA	Cálculo	30	Cálculo de la población establecida después de raleo en plantas/ha
ENFOL	Medición directa	60/90	Sanidad general de planta antes de floración. Escala de 1 (sano) a 5 (muy enfermo)
FLOR M	Medición directa	55-65	Días desde la siembra hasta el inicio de la emisión de polen en el 50% de las plantas de la parcela
FLOR F	Medición directa	55-65	Días desde la siembra hasta el estigma visible en el 50% de las plantas de la parcela
ROYAAMA	Medición directa	90	Roya Amarilla. Escala de severidad de 1 a 5
TURCICUM	Medición directa	90	Tizón por <i>Helminthosporium turcicum</i> . Escala de severidad de 1 a 5
CERCOS	Medición directa	90	<i>Cercospora</i> sp. Escala de severidad de 1 a 5
PLANCOS	Medición directa	130	Número de plantas cosechadas
POBLACOS	Cálculo	130	Población establecida a cosecha en plantas/ha
NUMPLANVOLC	Medición directa	130	Número de plantas con volcamiento
PORCPLANVOLC	Cálculo	130	Porcentaje de plantas con volcamiento
PORCHUMED	Medición directa	140	Porcentaje de humedad de grano en determinador de humedad
PCAMPO	Pesaje en campo	140	Peso de campo de mazorcas sin capacho
PORCGRANO	Cálculo	140	Porcentaje de grano en la muestra (también llamado índice de desgrane). Porcentaje del peso del grano en relación con el peso de campo (mazorca completa)
NUMMAZSAN	Medición directa	140	Número de mazorcas sanas
NUMMAZENF	Medición directa	140	Número de mazorcas enfermas
MAZCOS	Cálculo	140	Número total de mazorcas cosechadas. Suma de mazorcas sanas y enfermas

PORCMAZENF	Cálculo	140	Porcentaje de mazorcas enfermas
PROLIFICIDAD	Cálculo	140	Prolificidad. División de MAZCOS entre PLANCOS. Si la proporción es mayor a uno quiere decir que el material es prolífico. Si es menor indica horras o robo de mazorcas
ASMAZ	Medición directa	140	Aspecto de mazorca. Evaluación desde el punto de vista comercial. 1 (muy bueno) a 5 (muy malo)
NUMHILERAS	Medición directa	140	Número de hileras
LLENADO	Medición directa	140	Llenado de la punta de la mazorca. 1 (muy bueno) a 5 (muy malo)
COLORGR	Medición directa	140	Color de grano en maíz amarillo a cosecha. La transformación de categoría a número se da así: Rojo =4, Amarillo pálido=3, Amarillo normal=2, Naranja=1.
TIPOGR	Medición directa	140	Tipo de grano (cristalino a harinoso) a cosecha. La transformación a número se da de la siguiente manera: Harinoso= 4, semiharinoso=3, semicristalino=2 y cristalino =1
SANMAZ	Medición directa	140	Sanidad de grano. Peso de grano enfermo en la muestra.
RENDIM	Cálculo	140	Rendimiento (toneladas por hectárea) Se calcula el rendimiento por hectárea con los datos de peso de muestra desgranada y humedad de muestra desgranada.
INDEX	Cálculo	140	Índice de selección teniendo en cuenta las principales variables de mercado: rendimiento, sanidad y aspecto de mazorca, volcamiento de tallo y raíz y porcentaje de grano

*Días después de siembra.

1.3.3 Análisis de datos

Los ensayos fueron establecidos en un diseño de bloques aumentados, con cuatro testigos comerciales, para los cuales se realizó un análisis de varianza individual, para posteriormente usar las variables ajustadas en el análisis combinado. Los datos conforman un conjunto de F1, con parentales, y sin recíprocos. Éstos fueron analizados usando el aplicativo de CIMMYT AGD-R (Analysis of Genetic Designs with R for Windows) versión 5.0 (Rodríguez et al., 2015), de acuerdo con el método 2 propuesto por Griffing, utilizando un modelo mixto (Modelo B) en donde los genotipos son fijos y los

bloques aleatorios. Para el análisis, los ensayos se utilizaron como bloques para un total de 4 repeticiones, correspondientes a los dos semestres en cada localidad. Para determinar la importancia de los caracteres fenotípicos se realizó un análisis de componentes principales para las variables más importantes en el programa de mejoramiento y se determinaron las relaciones entre los caracteres evaluados con un análisis de correlación fenotípica usando el software estadístico R Studio (RStudio Team, 2022).

Se determinaron: Habilidad Combinatoria General (HCG_i), Habilidad Combinatoria Específica (HCE_i), Heterosis, Varianza Aditiva (σ^2A), Varianza de Dominancia (σ^2D), Varianza fenotípica (σ^2p) y Heredabilidad en sentido amplio (H^2) y estrecho (h^2), a partir del siguiente modelo.

$$y_{ijk} = u + Rep_k + HCG_i + HCE_{ij} + B(R_k) + e_{ijk}$$

Donde,

y_{ijk} = valor observado

u = media general

REP_k = repeticiones (Ensayos)

HCG_i = habilidad combinatoria general

HCE_i = habilidad combinatoria específica

$B(R_k)$ = efecto aleatorio de bloques

e_{ijk} = residual

La estimación de varianzas, y heredabilidad en sentido amplio y estrecho se realizaron de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Varianza de habilidad combinatoria general =

$$\sigma^2_{HCG} = \frac{1}{r(p+2)} (CM_{HCG} - CM_{HCE})$$

Varianza de habilidad combinatoria específica = $\sigma^2_{HCE} = \frac{1}{r} (CM_{HCE} - CM_e)$

Varianza de dominancia = $\sigma^2_D = \sigma^2_{HCE}$

$$\text{Varianza aditiva} = \sigma_A^2 = 2\sigma_{HCG}^2$$

$$\text{Varianza fenotípica} = \sigma_P^2 = 2\sigma_{HCG}^2 + \sigma_{HCE}^2 + \frac{\sigma_e^2}{r}$$

$$\text{Heredabilidad en sentido amplio} = H^2 = \frac{\sigma_A^2 + \sigma_D^2}{\sigma_P^2}$$

$$\text{Heredabilidad en sentido estrecho} = h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

La importancia relativa de la HCG y HCE se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{2K_{HCG}^2}{2K_{HCG}^2 + 2K_{HCE}^2}$$

presentada por Badu-Apraku et al. (2013), donde K_{HCG}^2 es la varianza de los efectos derivados del cuadrado medio de la HCG y K_{HCE}^2 corresponde a la varianza de los efectos derivados del cuadrado medio de la HCE. Considerando que la varianza total de un híbrido F1 es igual al doble del componente HCG más el componente HCE, se determinó que cuanto más cercano a la unidad sea el valor obtenido, se tendrá mayor predictibilidad del comportamiento de un híbrido en particular con base en la HCG por sí misma (Badu-Apraku et al., 2013).

1.3.4 Clasificación de líneas en grupos heteróticos

La clasificación de las líneas en grupos heteróticos se realizó mediante dos metodologías diferentes: Con base en la HCE de los cruzamientos para el rendimiento promedio de grano, de acuerdo con la suposición de que la habilidad combinatoria específica entre dos líneas de diferentes grupos heteróticos es superior que la que se presenta entre líneas del mismo grupo, las 30 líneas fueron clasificadas en dos grupos heteróticos con base en la habilidad combinatoria específica de los cruzamientos donde participó cada línea. De acuerdo con el procedimiento indicado por Oyetunde et al. (2020), las líneas que formaron híbridos con efectos de HCE negativos se asignaron al mismo grupo heterótico, mientras que las líneas parentales de híbridos con efectos de HCE positiva se

clasificaron en grupos heteróticos diferentes. Por otra parte, aplicando la aproximación propuesta por Badu-Apraku et al. (2013), se clasificaron las líneas con base en la HCG de múltiples rasgos (HGCAMT, por sus siglas en inglés, Heterotic grouping based on GCA of multiple traits). Para esto, se realizó una estandarización de los efectos de la HCG de los rasgos evaluados, para minimizar los efectos de las diferentes escalas de medición para cada rasgo (Badu-Apraku et al., 2013). Se incluyeron las variables altura de planta (alpla), altura de mazorca (almaz), floración masculina (florm), floración femenina (florf), aspecto de mazorca (asmaz), color de grano (colorgr), tipo de grano (tipogr) y rendimiento de grano (rendim), para un total de 8 rasgos que presentaron efectos aditivos significativos en los ambientes evaluados. Una vez estandarizados los valores, se realizó un análisis de clúster usando el método de Ward de varianza mínima usando el software estadístico R Studio (RStudio Team, 2022), y se construyó un dendrograma basado en el agrupamiento. En los dos análisis realizados se incluyó el origen de las líneas de acuerdo con la información del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A., para establecer si el origen está relacionado con el agrupamiento en grupos heteróticos.

1.4 Resultados

En las tablas 1-2, 1-3 y 1-4, se presentan los análisis de varianza obtenidos en el análisis de datos por medio de GEA-R en las variables de componentes de rendimiento, aspectos de planta y enfermedades evaluadas. En el análisis de varianza se observó que los factores de variación repetición y cruzamiento fueron significativos para todas las variables evaluadas, excepto para las enfermedades foliares prefloración y Turcicum. También se presentó significancia en la HCG y en la HCE para los componentes de rendimiento y las variables de planta, excepto para número de hileras. Por otra parte, las variables de sanidad no presentaron significancia en la HCG y HCE, excepto la enfermedad roya.

Tabla 1-2 Cuadrados medios para las variables registradas de rendimiento de grano, peso de mazorcas, peso de grano, hileras, altura de mazorca (cm), altura de planta (cm).

	GL	Rendimiento de grano (t/ha)	Peso Mazorcas (Kg)	Peso grano (Kg)	Numero de Hileras	Altura de Mazorca (cm)	Altura de Planta (cm)
REP	3	408,0 ***	895,1 ***	278,2 ***	109,9 ***	54625.1 ***	89468.1 ***

Cross	464	10,4	***	12,3	***	7,6	***	7,1	***	388.7	***	520.7	***
HCG	29	26,9	***	38,5	***	20,0	***	81,1	ns	6107.8	***	7861.5	***
HCE	435	9,1	***	10,3	***	6,6	***	2,2	***	219.5	***	312.0	***
Residual	1379	1,4		1,5		1,0		1,1		99.8		116.1	

REP= Repetición; Cross= Cruzamientos; HCG= Habilidad Combinatoria General; HCE= Habilidad combinatoria específica. ** Diferencias estadísticas significativas, P<0.05, *** Diferencias estadísticas altamente significativas, P<0.001.

Tabla 1-3. Cuadrados medios para las variables registradas: aspecto de mazorca, color de grano, tipo de grano, días a floración masculina, días a floración femenina.

	GL	Aspecto de Mazorca	Color de Grano	Tipo de Grano	Días a Floración Masculina	Días a Floración Femenina					
REP	3	175,5	***	12,8	***	0,7	*	932.07	***	377.05	***
Cross	464	1,3	***	5,7	***	1,3	***	8.15	***	11.91	***
HCG	29	6,5	***	107,7	***	18,6	***	102.95	***	150.69	***
HCE	435	1,0	***	1,0	***	0,6	***	1.72	***	2.35	***
Residual	1379	0,5		0,4		0,2		1.13		1.16	

REP= Repetición; Cross= Cruzamientos; HCG= Habilidad Combinatoria General; HCE= Habilidad combinatoria específica. ** Diferencias estadísticas significativas, P<0.05, *** Diferencias estadísticas altamente significativas, P<0.001.

Tabla 1-4. Cuadrados medios para las variables registradas Turcicum, Cercospora, Roya y enfermedades foliares prefloración (Enfol).

	GL	Turcicum	Cercospora	Roya	Enfol				
REP	3	611.41	***	641.45	***	104.53	***	99.93	***
Cross	464	0.48	ns	0.70	*	0.38	***	0.17	ns
HCG	29	2.30	ns	3.97	ns	1.74	***	0.87	ns
HCE	435	0.37	ns	0.49	ns	0.30	***	0.13	ns
Residual	1379	0.43		0.55		0.28		0.15	

REP= Repetición; Cross= Cruzamientos; HCG= Habilidad Combinatoria General; HCE= Habilidad combinatoria específica. ** Diferencias estadísticas significativas, $P < 0.05$, *** Diferencias estadísticas altamente significativas, $P < 0.001$.

En el análisis de componentes principales se determinó que los cinco primeros componentes explicaron el 75,23% de la variación observada. Los componentes principales 1, 2, 3 4 y 5 explican el 28.13%, 18.75%, 12.56%, 8.38% y 7.43% del total de la varianza, respectivamente. El componente principal uno está compuesto por rendimiento, peso de grano, altura de planta, altura de mazorca, y número de mazorcas enfermas. El segundo está compuesto por floración femenina, floración masculina y porcentaje de grano. El tercero está compuesto por porcentaje de humedad de grano. El cuatro está compuesto por número de hileras, y el quinto está compuesto por aspecto de mazorca y número de plantas volcadas (Tabla 1-5).

En las correlaciones fenotípicas se incluyeron las variables cuantitativas evaluadas más relevantes para el programa de mejoramiento y el aspecto de mazorca, ya que, pese a ser una variable cualitativa, corresponde a un indicador para los mejoradores del potencial de mercado de un híbrido. El análisis de correlación reveló que el rendimiento de grano esta significativa y positivamente correlacionado con la altura de planta ($r=0.69$), altura de mazorca ($r =0.5$), número de hileras ($r=0.31$), aspecto de mazorca ($r=0.19$), peso de grano ($r=1.0$) y porcentaje de grano ($r=0.22$). Por otra parte, el rendimiento de grano está significativa y negativamente correlacionado con los días a floración masculina ($r=-0.09$), floración femenina ($r=-0.19$), plantas volcadas ($r=-0.42$) y porcentaje de humedad de grano a cosecha ($r=-0.02$) (Figura 1-1). La floración femenina y la floración masculina están significativamente correlacionadas ($r=0.86$), así como la altura de planta y la altura de mazorca ($r=0.83$) y el porcentaje de grano y el peso de grano ($r=0.21$).

Tabla 1-5 Componentes principales para 12 características en híbridos de maíz para el rendimiento de grano y otros caracteres evaluados en híbridos de maíz de origen tropical en un ensayo de tipo dialelo con 30 parentales involucrados.

Carácter	Componentes principales				
	1	2	3	4	5
FLORM	0.21	0.89	-0.04	-0.02	-0.09
FLORF	0.14	0.89	0.07	-0.05	-0.01
ALPLA	0.76	-0.06	0.50	-0.09	-0.02

ALMAZ	0.68	0.00	0.56	-0.12	-0.07
NUMPLANVOLC	-0.44	-0.09	0.17	0.38	-0.51
NUMHILERAS	0.31	-0.16	-0.19	0.77	-0.03
NUMMAZENF	-0.63	-0.04	0.24	-0.06	0.34
ASMAZ	0.34	0.30	0.09	0.43	0.63
PDESGRA	0.84	-0.19	-0.39	-0.08	-0.06
PORCGRANO	0.01	-0.64	0.08	-0.13	0.29
PORCHUMED	-0.16	0.18	-0.74	-0.18	0.11
RENDIM	0.86	-0.22	-0.33	-0.07	-0.07
Varianza	3.38	2.25	1.51	1.01	0.89
%Varianza	28.13	18.75	12.57	8.39	7.43

Florm= floración masculina; Florf= floración femenina; Alpa= altura de planta; Almaz=altura de mazorca; Numplanvolc=número de plantas volcadas en la parcela; Nummazenf= número de mazorcas enfermas; Asmaz= aspecto de mazorca; Pdesgra= peso de grano; Porcgrano= porcentaje de grano; Porchumed= porcentaje de humedad de grano; Rendim= rendimiento de grano.

En la tabla 1-6 se detallan los valores de habilidad combinatoria general para las variables alpa, almaz, asmaz, florm, florf, colorgr, tipogr y rendim en los 30 parentales evaluados, junto con la significancia y la importancia relativa de la HCG para cada rasgo. Se observó que para la variable rendimiento de grano (rendim) 17 parentales presentaron valores positivos y 12 parentales presentan valores negativos para la HCG, siendo LB10, LA13, LB37, LB33 y LA06 las líneas con HCG más alta.

La habilidad combinatoria específica se presenta en la figura 1-2, que corresponde a la matriz de cruzamientos con el valor calculado de HCE, donde se muestra una escala de color de rojo a verde, que permite apreciar los valores negativos, cercanos a cero y positivos, respectivamente. Adicionalmente, los valores detallados se presentan en el Anexo 1. Las mejores combinaciones o de mejor habilidad combinatoria específica son LB04/LB33, LB22/LA03, LA14/LA06, LB15/LA08 y LB06/LA03.

Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

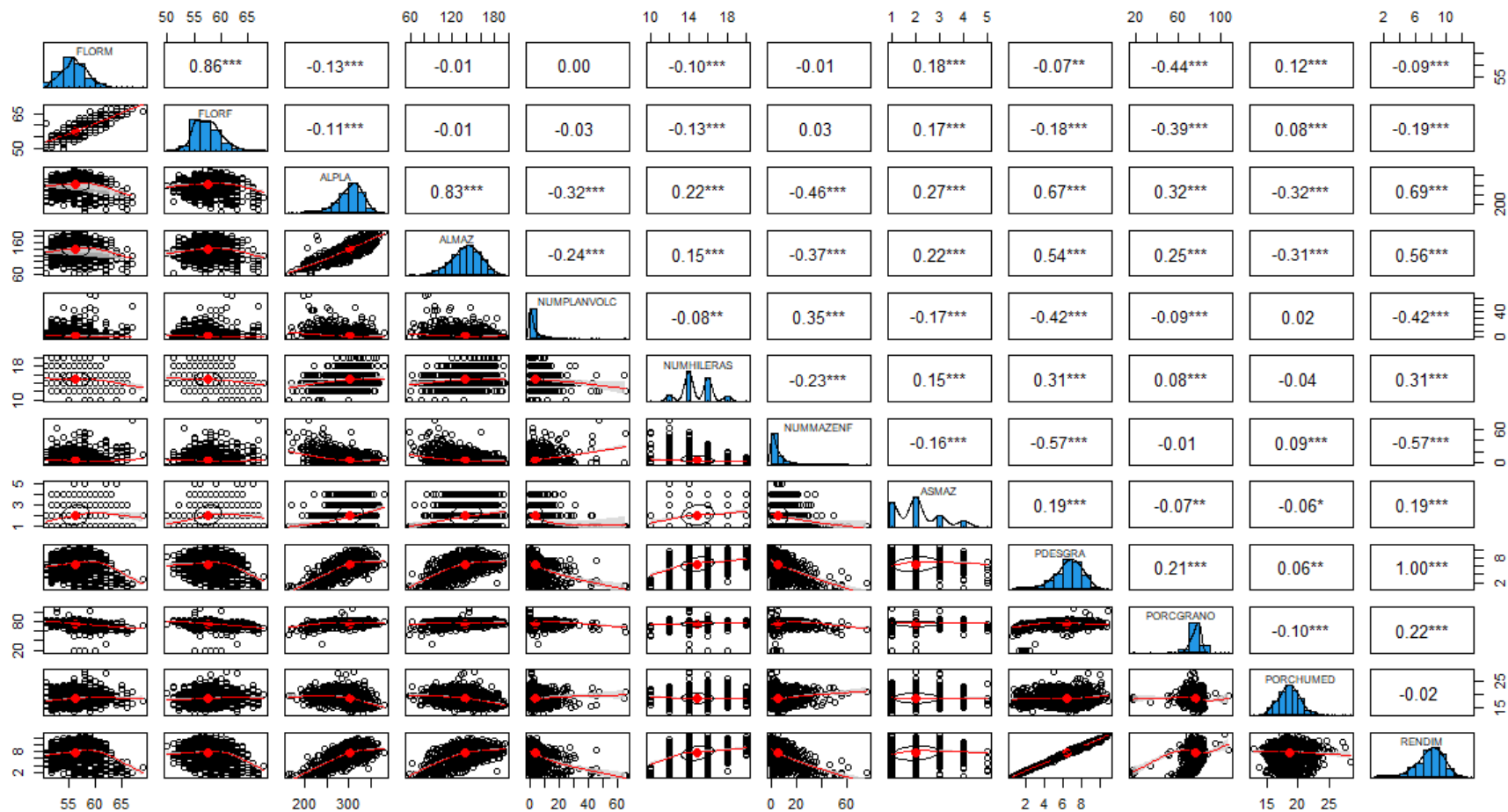


Figura 1-1 Correlaciones fenotípicas para el rendimiento de grano y otros caracteres evaluados en híbridos de maíz de origen tropical en un ensayo de tipo dialélico con 30 parentales involucrados. Florm= floración masculina; Florf= floración femenina; Alpa= altura de planta; Almaz= altura de mazorca; Numplanvolc= número de plantas volcadas en la parcela; Nummazenf= número de mazorcas enfermas; Asmaz= aspecto de mazorca; Pdesgra= perso de grano; Porcgrano= porcentaje de grano; Porchumed= porcentaje de humedad de grano; Rendim= rendimiento de grano.

Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

Tabla 1-6. Estimación de Habilidad Combinatoria General en ocho características fenotípicas para 30 líneas endogámicas de Maíz tropical.

Parental	ALMAZ	ALPLA	ASMAZ	COLORGR	FLORF	FLORM	RENDIM	TIPOGR
LA01	4.04 **	-3.50 **	0.06 ns	-1.19 ***	0.07 ns	0.61 ***	-0.28 **	-0.48 ***
LA02	-17.17 ***	-9.38 ***	0.13 **	-1.18 ***	-1.77 ***	-1.36 ***	-0.18 ns	-0.25 ***
LA03	-7.18 ***	-9.59 ***	0.13 **	-1.14 ***	-1.10 ***	-0.91 ***	-0.49 ***	-0.34 ***
LA04	-7.82 ***	-13.34 ***	0.04 ns	-1.14 ***	-2.14 ***	-1.66 ***	-0.16 ns	-0.11 **
LA05	-7.35 ***	-8.59 ***	0.09 ns	-0.93 ***	-0.25 **	-0.76 ***	-0.74 ***	-0.20 ***
LA06	6.28 ***	3.70 **	-0.11 ns	-0.67 ***	-0.51 ***	0.54 ***	0.43 ***	0.12 **
LA07	3.84 **	5.59 ***	0.28 ***	-0.87 ***	1.07 ***	1.04 ***	-0.59 ***	0.14 **
LA08	-14.46 ***	-9.14 ***	0.01 ns	-1.23 ***	-0.82 ***	-0.47 ***	0.34 **	0.00 ns
LA09	-0.64 ns	9.04 ***	-0.03 ns	-0.88 ***	0.18 ns	0.49 ***	0.02 ns	0.44 ***
LA10	5.54 ***	2.49 ns	-0.28 ***	-0.54 ***	0.94 ***	0.63 ***	0.25 **	-0.45 ***
LA41	10.20 ***	8.55 ***	0.21 **	-0.49 ***	1.14 ***	0.27 **	-0.07 ns	-0.24 ***
LA44	12.27 ***	17.09 ***	0.12 **	-0.91 ***	0.53 ***	0.46 ***	0.15 ns	-0.02 ns
LA13	7.22 ***	11.90 ***	-0.27 ***	-0.80 ***	-0.78 ***	0.27 **	0.77 ***	-0.39 ***
LA14	-14.21 ***	-7.14 ***	0.06 ns	-0.37 ***	1.31 ***	0.66 ***	-0.66 ***	-0.02 ns
LA15	4.82 ***	-4.84 **	-0.05 ns	-0.83 ***	-0.42 ***	-0.16 ns	0.32 **	0.46 ***
LB37	1.74 ns	0.21 ns	-0.44 ***	0.87 ***	0.29 **	-0.35 ***	0.64 ***	0.32 ***
LB33	5.97 **	7.23 ***	-0.29 ns	0.97 ***	2.75 ***	2.30 ***	0.59 ***	-0.18 ns
LB03	1.97 ns	8.28 ***	-0.05 ns	0.83 ***	-0.82 ***	-0.70 ***	0.40 ***	-0.18 ***
LB04	2.25 ns	-5.26 ***	0.10 ns	0.78 ***	-0.49 ***	-0.66 ***	0.07 ns	-0.22 ***
LB05	5.06 ***	4.17 **	-0.10 ns	0.73 ***	-0.29 **	-0.20 **	0.28 **	-0.28 ***
LB06	2.07 ns	-7.81 ***	0.21 **	0.83 ***	0.85 ***	0.86 ***	0.06 ns	-0.15 ***
LB07	10.21 ***	17.86 ***	-0.03 ns	0.98 ***	2.06 ***	1.95 ***	0.09 ns	1.26 ***
LB38	-10.58 ***	-11.43 ***	0.31 **	0.82 ***	-1.98 ***	-2.56 ***	-0.76 ***	-0.09 ***
LB10	-5.32 ***	-3.33 ***	-0.71 ***	0.78 ***	-1.47 ***	-1.13 ***	0.86 ***	-0.40 ***
LB11	10.37 ***	5.57 **	0.17 ***	0.99 ***	1.96 ***	2.02 ***	0.02 ns	0.50 ***
LB12	-1.11 ***	11.33 ***	-0.10 **	1.01 ***	0.52 ***	-0.17 ***	0.21 **	0.30 ***
LB13	-3.45 ns	-8.89 ***	0.33 ns	0.63 ***	-1.44 ***	-0.84 ns	-0.80 ***	-0.31 ***
LB15	-2.98 **	-3.89 ***	0.03 ***	1.14 ***	0.87 ***	0.24 ***	-0.50 ***	0.18 ***
LB22	3.08 ***	5.53 ***	0.02 ***	0.79 ***	-1.89 ***	-1.57 ***	-0.10 ns	0.00 **
LB32	-4.65 **	-12.39 **	0.15 ns	1.02 ***	1.63 ***	1.15 **	-0.17 ns	0.59 ***
I.R. HCG	0.64	0.59	0.38	0.87	0.82	0.86	0.34	0.74

** Diferencias estadísticas significativas, P<0.05, *** Diferencias estadísticas altamente significativas, P<0.001. ns Diferencias estadísticas no significativas. ALMAZ= altura de mazorca; ALPLA= altura de planta ASMAZ= aspecto de mazorca; COLORGR= color de grano; FLORF= días a floración femenina; FLORM= días a floración masculina; RENDIM= rendimiento de grano; TIPOGR= tipo de grano; I.R.HCG= Importancia relativa para la habilidad combinatoria general.

Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

	LA01	LA02	LA03	LA04	LA05	LA06	LA07	LA08	LA09	LA10	LA41	LA44	LA13	LA14	LA15	LB37	LB22	LB03	LB04	LB05	LB06	LB07	LB32	LB33	LB10	LB11	LB12	LB13	LB38	LB15	
LA01	-3.77																														
LA02	0.09	-3.99																													
LA03	-1.85	-1.95	-4.16																												
LA04	-0.13	-2.72	-1.57	-4.29																											
LA05	0.04	1.43	-0.33	-0.23	-3.22																										
LA06	-0.51	-0.60	0.65	0.48	0.31	-5.39																									
LA07	0.38	-2.01	-2.88	-1.33	0.00	0.22	-4.56																								
LA08	-0.73	-1.69	-3.52	-2.39	0.86	0.79	1.54	-6.54																							
LA09	0.36	0.76	0.23	1.24	-0.03	-0.84	1.19	0.56	-3.89																						
LA10	0.81	-0.06	1.63	0.98	0.86	1.14	1.30	0.39	0.23	-4.38																					
LA41	0.27	0.46	1.28	0.77	0.13	1.06	0.42	1.69	0.77	0.51	-4.11																				
LA44	0.48	0.66	-0.05	-1.10	0.19	0.44	0.33	0.76	0.28	-0.31	0.41	-4.39																			
LA13	1.10	0.10	0.71	0.54	0.81	0.26	0.08	1.40	1.32	0.30	-0.17	1.27	-5.20																		
LA14	0.52	1.29	1.38	0.54	-0.74	1.91	1.40	0.77	-0.68	0.34	0.17	0.46	1.35	-4.22																	
LA15	-0.45	0.32	1.36	1.22	0.62	-0.42	-0.46	1.34	-0.98	1.27	-0.08	1.23	-0.19	0.51	-5.79																
LB37	0.67	0.61	0.91	0.85	0.75	0.27	0.01	1.77	0.50	-0.17	0.30	-0.08	0.61	0.29	0.64	-4.69															
LB22	0.69	0.55	1.96	1.21	1.19	0.11	0.18	1.06	0.20	-0.09	0.01	-0.35	-0.06	-0.99	0.60	-0.66	-4.45														
LB03	0.12	0.33	0.59	0.83	0.14	-0.04	1.76	0.35	-0.83	0.43	-1.06	0.84	0.11	1.58	-0.01	0.01	0.36	-4.34													
LB04	-0.07	2.08	1.44	0.92	-0.48	-0.82	0.50	0.80	0.71	-1.43	0.80	0.39	0.23	0.94	1.11	0.02	0.77	0.84	-4.43												
LB05	0.91	1.23	1.01	0.91	-0.61	1.20	0.71	0.07	0.14	-1.26	0.08	0.15	0.31	0.89	0.72	1.28	0.52	0.35	-1.87	-4.30											
LB06	0.62	1.42	1.79	0.45	0.18	0.75	0.81	0.36	-0.25	-0.50	0.98	0.63	-0.31	0.33	0.85	1.14	0.88	0.45	-1.83	-2.86	-4.72										
LB07	1.17	1.01	0.92	0.44	0.50	0.86	0.17	0.69	0.55	1.01	0.47	-0.98	0.71	-0.79	-0.04	0.14	0.67	-0.45	0.38	0.88	1.08	-5.00									
LB32	0.44	0.69	-0.41	0.76	0.38	1.10	-0.22	1.48	1.14	0.16	0.26	0.63	0.42	-0.61	1.61	1.07	-0.08	-1.53	0.04	0.21	-0.50	0.99	-5.73								
LB33	-0.21	1.53	0.91	1.24	0.61	-0.12	1.23	0.09	0.98	0.35	-0.16	1.23	-0.86	-0.92	0.32	0.53	0.38	1.36	0.86	-0.35	0.86	-1.36	0.22	-5.50							
LB10	0.92	0.19	0.77	0.67	0.76	0.86	0.46	0.23	0.48	-0.10	-0.25	-0.83	-0.46	-0.22	0.07	1.52	-0.01	0.94	0.02	1.09	0.33	0.55	1.49	-0.03	-5.87						
LB11	0.29	0.90	-0.06	-0.07	1.33	0.55	-0.35	1.03	-0.65	0.25	0.32	1.03	0.30	-0.14	-0.20	-0.56	-0.27	0.19	0.49	1.23	1.13	-0.80	0.19	-0.24	0.03	-5.20					
LB12	0.43	0.43	1.48	0.90	-0.41	0.23	0.68	1.29	-1.19	0.24	-0.06	0.31	1.32	-0.06	0.53	-0.32	0.66	-0.63	1.07	1.12	0.22	-0.82	0.11	0.32	-0.09	1.82	-4.16				
LB13	0.35	0.35	0.17	0.36	-0.43	0.06	1.08	-0.48	-0.32	-0.03	-0.04	0.10	0.47	0.31	0.45	0.08	-1.24	0.34	0.23	0.63	-0.13	1.28	0.60	0.88	0.98	0.74	-0.19	-4.02			
LB38	-0.54	-0.10	1.13	1.05	-0.88	-0.25	0.62	0.72	0.29	-0.04	0.39	0.58	0.93	0.13	-0.21	-1.57	0.37	0.47	-0.29	0.71	0.18	0.49	-0.01	0.79	0.24	0.89	-0.51	0.48	-2.92		
LB15	1.34	0.70	0.64	1.78	-0.52	1.13	1.30	1.88	1.62	0.53	-1.53	0.10	-2.21	-1.52	-0.16	-1.21	0.29	0.83	1.01	-0.77	0.39	0.27	0.83	0.55	1.11	1.02	-0.57	0.97	-0.21	-4.79	

Figura 1-2. Estimación de la habilidad combinatoria específica (HCE) en la variable rendimiento para 30 líneas endocriadas de maíz de origen tropical. Tendencia de color: Rojo valores negativos, amarillo valores cercanos a 0 y verde valores positivos.

Capítulo 1: Determinación del patrón heterótico y habilidad combinatoria en líneas de maíz tropical a partir de cruzamientos dialélicos.

En la tabla 1-7 se presentan las estimaciones de las varianzas fenotípica, genética, aditiva y de dominancia, junto con la varianza de la HCG y HCE, además de la heredabilidad en sentido amplio y estrecho. El coeficiente de variación es bajo para las variables rendimiento de grano, peso de mazorcas, peso de grano, número de hileras, altura de mazorca, altura de planta, tipo de grano, y días a floración masculina. Por el contrario, las variables Turcicum, cercospora, roya, enfermedades foliares prefloración (Enfol) y color de grano presentan una alta dispersión de datos. Se puede observar que las variables rendimiento de grano, peso de mazorcas y peso de grano, presentan valores de varianza de dominancia de 1.93, 2.20 y 1,40 respectivamente, siendo mayor a la varianza aditiva. Consecuentemente presentan alta heredabilidad en sentido amplio (H^2), con valores de 0.81, 0.88 y 0.87, respectivamente. Sin embargo, su heredabilidad en sentido estricto (h^2) es baja siendo <0.2 . Por el contrario, las variables de número de hileras, altura de mazorca, altura de planta, tipo de grano, días a floración masculina, días a floración femenina y afectación por Turcicum, con valores de varianza de dominancia de 0.28, 29.93, 48.98, 0.09, 0.04, 0.15 y 0.30 respectivamente, tienen valores superiores de la varianza aditiva en relación con la varianza de dominancia, por tanto, sus valores de H^2 y h^2 son altos. En el caso de color de grano, la ∂^2A y la ∂^2D , presentan valores similares y por tanto su H^2 presenta valores medios, mientras que h^2 es baja.

Tabla 1-7 Estimación de varianzas y heredabilidades en cruzamientos dialélicos de líneas maíz de origen tropical.

	Rendimiento de grano (t*ha-1)	Peso Mazorcas (Kg)	Peso grano (Kg)	Hileras	Altura de Mazorca (cm)	Altura de Planta (cm)	Aspecto de mazorca	Color de Grano	Tipo de grano	Días a Floración Masculina	Días a floración femenina	Turcicum	Cercospora	Roya	Enfol
CM _{HCG}	26,90	38,5	20	81,1	6107,8	7861,5	5,10	72,19	14,09	102,95	150,69	2,30	3,97	1,74	0,87
CM _{HCE}	10,39	10,31	6,42	2,21	219,5	312	0,70	0,74	0,38	7,26	2,35	0,37	0,49	0,30	0,13
CM _e	1,40	1,5	1	1,1	99,8	116,1	0,43	0,37	0,20	1,13	1,16	0,43	0,55	0,28	0,15
∂^2_{HCG}	0,20	0,29	0,15	0,63	46,94	60,51	0,04	0,56	0,11	0,80	1,17	0,01	0,03	0,01	0,87
∂^2_{HCE}	1,93	2,20	1,40	0,28	29,93	48,98	0,07	0,09	0,04	0,15	0,30	-0,02	-0,02	0,01	0,15
∂^2_p	2,67	3,15	1,95	1,80	148,75	199,02	0,25	1,31	0,31	2,02	2,92	0,12	0,18	0,10	0,01
∂^2_A	0,40	0,58	0,30	1,25	93,88	121,02	0,07	1,12	0,22	1,59	2,34	0,03	0,05	0,02	-0,01
∂^2_D	1,93	2,20	1,40	0,28	29,93	48,98	0,07	0,09	0,04	0,15	0,30	0,02	0,02	0,01	0,06
H^2	0,87	0,88	0,87	0,85	0,83	0,85	0,57	0,93	0,84	0,86	0,90	0,38	0,39	0,29	0,02
h^2	0,15	0,18	0,15	0,69	0,63	0,61	0,29	0,86	0,70	0,79	0,80	0,24	0,30	0,23	-0,01
MEDIA	7.65	8.55	6.48	14.9	138.9	301.4	1.9	2.99	56.4	57.5	2.08	2.57	1.43	1.5	0.18
C.V	15.58	14.24	15.6	7.14	9.54	5.41	28.6	21.5	1.89	1.8	28.7	26	38.4	25.5	0.28

CM_{HCG} = Cuadrado medio de la Habilidad combinatoria general; CM_e : Cuadrado medio del Error; σ^2_{HCG} =Varianza de Habilidad combinatoria general; σ^2_{HCE} : Varianza de Habilidad combinatoria específica. σ^2_p : Varianza fenotípica; σ^2_A : Varianza aditiva; σ^2_D : Varianza de dominancia; H^2 : Heredabilidad amplia; h^2 : Heredabilidad estrecha.

La clasificación de las líneas en grupos heteróticos a partir de la habilidad combinatoria específica (HCE) (Bidhendi et al., 2009; Oyetunde et al., 2020), donde los parentales de los cruzamientos con menores valores de HCE se definieron como líneas pertenecientes al mismo grupo heterótico, y los valores más altos como líneas de diferentes grupos, se obtuvieron dos grupos con 8 y 22 líneas respectivamente, como se muestra en la tabla 1-8. En general, las líneas con origen en Centroamérica y Suramérica, excepto las líneas LA44, LB11 y LA13, fueron clasificadas en el grupo 1, mientras que todas las líneas de origen asiático se clasificaron en el grupo 2.

En los dos grupos establecidos se incluyeron líneas de color blanco y amarillo sin distinción, sin embargo, debido a que dentro del programa de mejoramiento usualmente se mantienen separadas las poblaciones de maíces blancos y amarillos, surgió la necesidad de realizar una nueva clasificación de los grupos heteróticos, diferenciando por color de grano. Al realizar la clasificación usando el criterio de separación por color de grano, se obtuvieron dos grupos heteróticos para líneas amarillas, nombrados grupo 1A y 2A, conformados por 9 y 6 líneas, respectivamente. En el grupo 1A se clasificaron las líneas de origen en Centroamérica, excepto la LA44, y la línea originaria de África, mientras en el grupo 2A se clasificaron todas las líneas de origen asiático (Tabla 1-9). Además, se obtuvieron dos grupos heteróticos para las líneas blancas, nombrados grupo 1B y 2B, conformados por 7 y 8 líneas, respectivamente. En el grupo 1B se clasificaron en su mayoría líneas de origen en Centroamérica junto con la línea LB22 de origen en Suramérica, y en el grupo 2B se clasificaron 5 líneas de origen en Suramérica y 3 líneas de origen en Centroamérica (Tabla 1-9).

Tabla 1-8. Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria específica de sus cruzamientos

Grupo 1		Grupo 2
LA01	LB03	LA02
LA05	LB04	LA03

LA06	LB05	LA04
LA09	LB06	LA07
LA10	LB07	LA08
LA41	LB32	LA44
LA13	LB33	LB11
LA14	LB10	LB13
LA15	LB12	
LB37	LB38	
LB22	LB15	

Los colores indican el origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.

Tabla 1-9. Clasificación de grupos heteróticos por color de grano, para 15 líneas de maíz blanco y 15 líneas de maíz amarillo de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria específica de sus cruzamientos

1A	2A	1B	2B
LA01	LA02	LB37	LB03
LA05	LA03	LB22	LB04
LA06	LA04	LB32	LB05
LA09	LA07	LB33	LB06
LA10	LA08	LB10	LB07
LA41	LA44	LB11	LB13
LA13		LB12	LB38
LA14			LB15
LA15			

Los colores indican el origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.

Por otra parte, a partir de la metodología de HGCAMT, aplicando el método de agrupación jerárquica de Ward, que permite formar grupos mutuamente excluyentes con base en la similitud respecto a las características especificadas (Ward, 1963), se obtuvo el dendograma presentando en la figura 1-2. De acuerdo con esta clasificación, se observan 3 grupos heteróticos, compuestos por 7, 14 y 9 líneas, respectivamente.

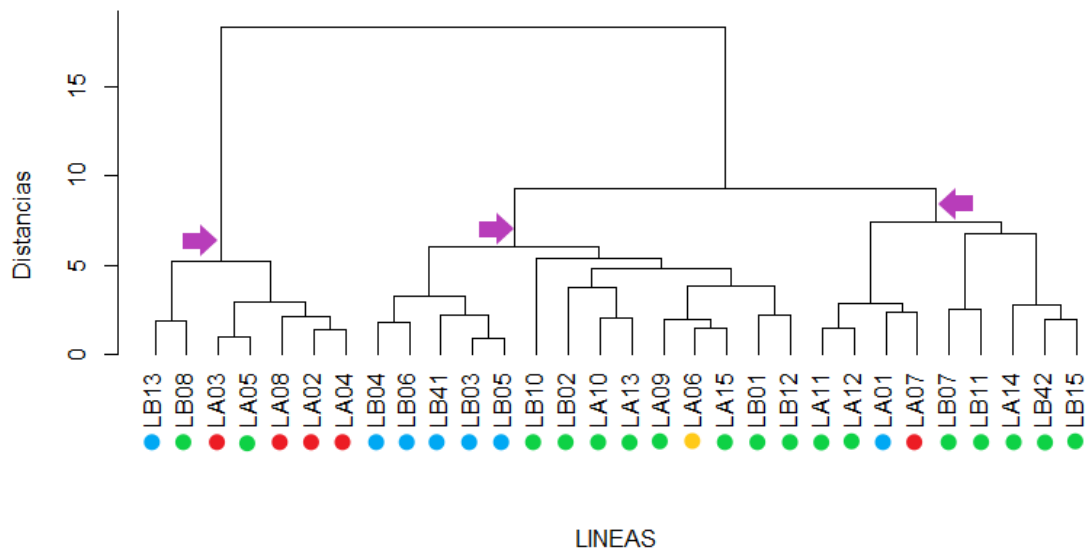


Figura 1-3 Dendrograma de 30 líneas de maíz de origen tropical construido a partir de los efectos de la HCG del rendimiento de grano y otros rasgos usando el análisis de clúster de mínima varianza de Ward. Los puntos de colores hacen referencia al origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.

La clasificación de las líneas fue diferente para las dos metodologías evaluadas, ya que, a partir de la HCE, involucrando los 30 parentales evaluados, se obtienen 2 grupos mientras que mediante HGCAMT es posible diferenciar 3 grupos. Sin embargo, las líneas LB13, LA03, LA08, LA02, y LA04 se clasificaron en un grupo aparte, coincidiendo en las dos metodologías.

A partir de la información de la HCG, es posible seleccionar líneas con potencial para ser usadas como probadores para clasificar nuevas líneas en grupos heteróticos. De acuerdo con Pswarayi & Vivek (2008) y Mhike et al. (2011), las líneas con potencial como probadores deben tener efectos de HCG positivos y significativos para el rendimiento de grano, además deben estar claramente clasificadas en un grupo heterótico y presentar buen rendimiento de grano por sí mismas. De acuerdo con estos criterios, la línea LB10 fue la línea con mayor rendimiento en las localidades evaluadas, además de presentar un efecto de HCG altamente significativo, por lo cual está línea se considera como candidata para ser usada como probador heterótico del grupo 2, así como la línea LA13 que es el segundo parental con mejor rendimiento y efectos de habilidad combinatoria general

altamente significativos, siendo también un candidato a probador para el grupo 2. Además, la línea LA08 fue la única línea con efectos de HCG significativamente positivos, y presentó un rendimiento alto respecto a las demás líneas del grupo, por lo que se considera un parental candidato para probador del grupo 1. Ninguna de las líneas clasificadas en el grupo heterótico 3 cumplió con los criterios para ser seleccionada como probador de este grupo.

1.5 Discusión

El ensayo de dialelo llevado a cabo en el presente estudio permitió la identificación de un número de grupos heteróticos diferente, de acuerdo con las metodologías de clasificación implementadas, indicando que el germoplasma evaluado presenta suficiente variabilidad genética, y que la habilidad combinatoria es un carácter determinante en la clasificación de genotipos en grupos genéticamente contrastantes que permitan explotar la heterosis en la formación de híbridos de maíz de alto rendimiento. La significancia en el análisis de varianza para los factores de variación repetición y cruzamiento de los componentes de rendimiento, indican que el comportamiento de los híbridos fue altamente influenciado por las condiciones ambientales (Messmer et al., 2009), y que la respuesta a este es diferente según el genotipo, similar a lo reportado por Murtadha et al., 2018), además, es un indicador de la existencia de diversidad entre los híbridos evaluados. La significancia en la HCG para los componentes de rendimiento, excepto número de hileras, y para las características de planta indica que la variabilidad observada puede ser atribuida a efectos génicos aditivos, mientras que la significancia en la HCE indica que los parentales de los híbridos evaluados presentan cierta complementariedad entre ellos indicando efectos génicos no aditivos (Lu et al., 2020; Medici et al., 2004; Murtadha et al., 2018).

Usualmente, el análisis de componentes principales es usado para reducir el número de variables que pueden ser usadas posteriormente para la caracterización y clasificación de genotipos, lo cual es especialmente valioso cuando se tiene un alto número de materiales donde se evalúa un gran número de rasgos (Beiragi et al., 2012). En el presente estudio fue posible evidenciar que el rendimiento de grano, la altura de planta y de mazorca, y el número de mazorcas enfermas son los principales rasgos discriminatorios que diferencian los genotipos evaluados, lo cual coincide con otros

reportes en literatura (Alika et al., 1993). Los resultados observados concuerdan con los hallazgos de Beyene et al. (2005), quienes indican que los rasgos morfológicos como altura de planta y de mazorca, y días a floración femenina y masculina, son los principales rasgos discriminatorios asociados a los primeros componentes principales, sin embargo, difieren en la evaluación del rendimiento de grano, que domina en el tercer componente principal, mientras que en el presente estudio se encuentra en el primer componente principal. Por otra parte, Al-Naggar et al. (2020), encontraron que dentro de los rasgos morfológicos evaluados que presentan mayor variación, y por tanto se sugiere que son las más discriminatorias, se encuentran rendimiento de grano, altura de planta y de mazorca, floración femenina y masculina, encontrándose en los dos primeros componentes principales, en concordancia con los resultados del presente estudio. La evaluación de caracteres fenotípicos contribuye al agrupamiento de los genotipos evaluados, y es de gran utilidad para el mejoramiento ya que permite tener un panorama de la variabilidad existente e identificar la necesidad de introducir germoplasma adicional para características requeridas en las poblaciones de mejoramiento (Al-Naggar et al., 2020). El germoplasma evaluado incluye genotipos con características contrastantes respecto a altura de planta y mazorca, lo cual puede ser útil en el desarrollo de híbridos con mayor desarrollo de biomasa para ser usados como forraje. También se observaron comportamientos contrastantes en rendimiento de grano y sanidad de mazorca, siendo este último un rasgo de gran interés en la producción de maíz para choclo y para grano duro en regiones tropicales donde se puede tener humedades relativas altas, por lo cual desarrollar híbridos con resistencias a enfermedades de grano será de gran utilidad.

El análisis de correlación entre los caracteres fenotípicos evaluados mostró una correlación significativa entre la mayoría de las variables evaluadas y el rendimiento de grano. Los días a floración femenina y masculina presentan un efecto negativo en el rendimiento de grano, mientras que la altura de planta y de mazorca tienen un efecto positivo, concordando con otros reportes (Bello et al., 2010; Nardino et al., 2016). Las plantas volcadas y el número de mazorcas presentan una correlación negativa con el rendimiento de grano, acorde con lo esperado, puesto que las pérdidas de plantas por volcamiento durante el ciclo de cultivo conllevan a tener menor cantidad de mazorcas cosechadas, mientras que las mazorcas enfermas pueden presentar menor peso respecto a las mazorcas sanas. De acuerdo con los resultados obtenidos, los rasgos

evaluados pueden ser usados para realizar selección indirecta del rendimiento de grano, como variable dependiente, en estados iniciales de selección de híbridos y parentales (Jamshidian et al., 2013).

De las 30 líneas evaluadas, 17 presentaron efectos positivos para la HCG, de los cuales 11 tuvieron efectos significativos, lo cual propone que estos parentales difieren de los demás en la acumulación de alelos favorables para el rasgo de rendimiento (Hassan et al., 2020; Murtadha et al., 2018). Por otra parte, los efectos significativos positivos en la HCE de los híbridos indican que se presenta heterosis entre las combinaciones específicas para el rasgo de rendimiento, en concordancia con los resultados obtenidos por Murtadha et al. (2018). Las variables altura de planta y de mazorca, color de grano, floración femenina y masculina, y tipo de grano presentaron valores de importancia relativa de la HCG cercanos a la unidad, indicando que para estos caracteres son más importantes los efectos aditivos que los efectos no aditivos, lo cual coincide con otros reportes en literatura (Badu-Apraku et al., 2013; Revilla et al., 1999). Sin embargo, aspecto de mazorca y rendimiento de grano presentaron valores inferiores de importancia relativa de la HCG, con 0.38 y 0.34, contrario a lo reportado por Badu-Apraku et al. (2013), quienes observaron valores de 0.75 y 0.70, respectivamente, cuando estos caracteres son evaluados en condiciones de estrés. Otros autores indican que para el rendimiento de grano los efectos de la HCG y HCE son significativos y por tanto el carácter está controlado tanto por efectos aditivos como por efectos no aditivos (Derera et al., 2008; Mhike et al., 2011).

El rendimiento de grano, y los componentes de rendimiento peso de mazorca y peso de grano presentan alta σ^2_b y alta H^2 , pero baja σ^2_a y h^2 , confirmando que la variación en estos rasgos está dada principalmente por efectos de dominancia, lo cual es esperado en el mejoramiento de híbridos, acorde con lo descrito por Hassan et al. (2020), quienes reportan una varianza de HCG menor a la varianza de la HCE para el rendimiento de grano en un ensayo de dialelo parcial entre cinco líneas endocriadas, y una baja varianza aditiva (53.72) respecto a la varianza de dominancia (3613.93), lo cual se atribuye a la predominancia de los efectos de dominancia. Así mismo, Shahrokhi et al. (2013), reportan alta H^2 (0.86) pero baja h^2 (0.16), atribuido a los efectos no aditivos. También, Hussain et al. (2014), basados en un diseño dialélico completo de ocho parentales, encontraron que la heredabilidad en sentido amplio en el rendimiento de grano fue de

0.51, mientras que la h^2 fue apenas de 0.13, principalmente debido a los efectos no aditivos y de dominancia. La predominancia de los efectos génicos dominantes junto con la baja heredabilidad en sentido estrecho para el rendimiento de grano sugiere la importancia de la heterosis en el proceso de mejoramiento (Begum et al., 2018). Sin embargo, otros autores reportan valores altos para H^2 y h^2 en el rendimiento de grano y los componentes de rendimiento, indicando que los caracteres están controlados por la acción génica aditiva, por lo cual se podría realizar selección directa del carácter para el mejoramiento en lugar de buscar explotar la heterosis (Bfinziger & Lafitte, 1997; Khakwani et al., 2020; Yousuf & Saleem, 2002). Los resultados encontrados son interesantes y alentadores para el programa de mejoramiento puesto que como lo describen Awata et al. (2018), para los programas de mejoramiento cuya finalidad es la obtención de híbridos se espera aprovechar los efectos no aditivos.

Por otra parte, las variables de altura de planta y de mazorca, días a floración femenina y masculina, mostraron una ∂^2_{HCG} superior a la ∂^2_{HCE} , así como una ∂^2_A superior a la ∂^2_D , lo cual sugiere un alto componente aditivo en la variación de estos rasgos, adicionalmente se presentan valores altos de H^2 y h^2 , en concordancia con los resultados reportados por Shahrokhi et al. (2013), quienes presentan valores altos de heredabilidad en sentido estrecho para los rasgos altura de planta y altura de mazorca, atribuidos a la importancia relativa de los efectos de aditividad para estos rasgos. Sin embargo, otros autores reportan resultados contrastantes, como Ji et al. (2006), quienes reportan que los efectos de la HCG son menores que los efectos de la HCE indicando la importancia de los efectos de dominancia para altura de planta y altura de mazorca.

La clasificación de líneas en grupos heteróticos a partir de la HCE permitió la identificación de dos grupos compuestos por 22 y 8 líneas, respectivamente, al clasificar los genotipos sin considerar el color de grano como factor de segregación. Esta clasificación es posible debido a la consideración de que el patrón heterótico hace referencia al cruzamiento de un par específico de parentales, pertenecientes a grupos heteróticos diferentes, por lo que se expresa una alta heterosis y en consecuencia presentan un mejor comportamiento agronómico (Bidhendi et al., 2009; Chandel et al., 2019). Esta clasificación permite la explotación de la heterosis en maíz, contribuyendo al comportamiento de los híbridos, tal como lo reportan Bidhendi et al. (2009), quienes

clasificaron 14 líneas endocriadas de maíz con base en los valores de heterosis y la habilidad combinatoria específica, obteniendo dos grupos heteróticos definidos. Sin embargo, aunque la clasificación de líneas a partir de la HCE del rendimiento de grano sigue siendo ampliamente utilizada, esta metodología presenta limitaciones ya que los efectos de la HCE están ampliamente influenciados por la interacción entre las líneas y entre los híbridos y el ambiente, por lo cual pueden presentarse variaciones en la asignación de las líneas en diferentes ensayos que involucren los mismo parentales (Fan et al., 2009, 2018; Oyetunde et al., 2020).

Debido a estas limitaciones de la HCE, Badu-Apraku et al. (2013), propusieron una metodología de clasificación basada en los efectos de la HCG de múltiples rasgos, lo cual puede constituir una opción con mayor predictibilidad y uso en las agrupaciones heteróticas de las líneas, ya que la HCG mide los efectos génicos aditivos para cada rasgo. Mediante el método HGCAMT, se lograron identificar tres grupos heteróticos compuestos por 7, 14 y 9 líneas, respectivamente, lo que implica que esta metodología permite visualizar mayor variabilidad genética en las líneas evaluadas, contrario a lo reportado por Oyetunde et al., (2020), quienes identificaron mayor número de grupos heteróticos a partir de la HCE que en la metodología HGCAMT. Sin embargo, expresan que la metodología HGCAMT es más estable en diferentes condiciones de evaluación. Además, Oyetunde et al. (2020) utilizaron probadores heteróticos de grupo conocido para la clasificación a partir de HCE, por lo cual los grupos encontrados corresponden a grupos previamente definidos, mientras que en el presente estudio la clasificación se realizó sin conocimiento previo de las agrupaciones.

Usualmente se implementa el uso de líneas probadoras de grupo heterótico conocido para clasificar las demás líneas, tal como lo reportado por Menkir et al. (2004), quienes clasificaron 38 líneas endocriadas tropicales de mediana altitud, cruzándolas con los probadores endocriados, que representaban el patrón heterótico cristalino y dentado, respectivamente. Por otra parte, Chandel et al. (2019) clasificaron 11 líneas endocriadas de color amarillo desarrolladas para obtener maduración temprana, usando 2 probadores diversos, mediante un diseño de cruzamientos línea por probador, con un total de 22 cruzamientos evaluados. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, fue posible determinar 3 líneas parentales como posibles probadores heteróticos para

dos de los grupos identificados, lo cual puede ser de utilidad en la clasificación de nuevas líneas endocriadas en el programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A.

La caracterización de la diversidad genética de líneas endocriadas derivadas de diferentes orígenes puede maximizar la eficiencia en la obtención de combinaciones híbridas y en el desarrollo de líneas (Xia et al., 2005), puesto que algunos autores sugieren que los antecedentes genéticos de las líneas endocriadas y su origen pueden representar potencialmente grupos heteróticos (Menkir et al., 2004a). Este planteamiento se evidencia en el agrupamiento de las líneas, mediante ambas metodologías, donde es posible observar que los grupos heteróticos identificados, en general, están conformados por líneas del mismo origen.

1.6 Conclusiones

El análisis de componentes principales y de correlación de los caracteres fenotípicos permitió evaluar la diversidad genética presente en los híbridos evaluados, evidenciando una variación substancial en los rasgos evaluados en el germoplasma, así como las relaciones entre las variables evaluadas y el rendimiento de grano, en aras de establecer caracteres que permitan realizar selección indirecta. La caracterización del germoplasma es de gran utilidad para el programa de mejoramiento genético ya que permite la selección de genotipos de acuerdo con los objetivos del programa.

Los resultados del presente estudio revelaron que el rendimiento y sus componentes presentan una baja proporción de efectos de HCG respecto a la HCE en las líneas involucradas, presentando una mayor proporción de varianza de dominancia que de varianza aditiva, lo cual es positivo en un programa de mejoramiento basado en la obtención de híbridos donde se busca explotar la heterosis. Por otra parte, las variables de altura de planta y de mazorca, y los días a floración, presentan efectos de HCG superiores a los efectos de HCE, junto con una alta varianza aditiva, indicando la importancia de los efectos de aditividad para estos rasgos, por lo cual el conocimiento de los caracteres de los parentales es de gran importancia en la selección de estas características.

Ambas metodologías presentaron resultados similares en la agrupación de líneas donde fue posible observar que el origen del germoplasma es un factor determinante en la agrupación, sin embargo, la HCG sólo permitió la identificación de dos grupos heteróticos cuando se evalúan las 30 líneas juntas, sin distinción por color de grano, mientras que HGCAMT permitió la identificación de 3 grupos. La clasificación a partir de un ensayo de tipo dialelo permitió identificar los híbridos LB04/LB33, LB22/LA03, LA14/LA06, LB15/LA08 y LB06/LA03 como las mejores combinaciones en el presente estudio por lo cual podrán ser evaluados en ensayos multi-localidad para ser candidatos a híbridos comerciales. Además, las líneas LB10, LA13 y LA08 se identificaron como posibles probadores representantes de 2 de los 3 grupos heteróticos identificados, para ser usadas posteriormente en ensayos de línea por probador, para clasificar nuevas líneas.

Capítulo 2: Estructura genética y determinación de grupos heteróticos de líneas endocriadas de maíz de origen tropical a partir de marcadores tipo SNP.

2. Capítulo 2: Estructura genética y determinación de grupos heteróticos de líneas endocriadas de maíz de origen tropical a partir de marcadores tipo SNP.

2.1 Resumen

Dentro de los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de híbridos, el conocimiento de la diversidad genética y fenotípica del germoplasma disponible y la determinación de grupos heteróticos es de gran importancia ya que constituye el punto de partida de las estrategias de mejoramiento. Los marcadores moleculares pueden ser usados en la determinación de grupos heteróticos, permitiendo caracterizar un gran número de líneas endocriadas y establecer distintas agrupaciones de genotipos con base en distancias genéticas. El objetivo del presente estudio fue determinar la estructura poblacional y los grupos heteróticos presentes en una población de 66 líneas endocriadas de maíz de origen tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. a partir de marcadores moleculares tipo SNP. Las líneas fueron genotipificadas mediante el arreglo Maize50K SNP BeadChip, encontrando un total de 12.209 SNPs informativos que permitieron evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional a partir de un análisis de componentes principales y a partir del modelo Bayesiano MCMC implementado en el software STRUCTURE. Adicionalmente, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) a partir de los datos fenotípicos de los materiales, esta técnica multivariada que puede ser útil en la descripción de la diversidad fenotípica en los programas de mejoramiento. Se identificaron tres subpoblaciones con valores de F_{st} entre 0,0708 y 0,4447, presentando una mayor diferenciación en dos de las tres subpoblaciones encontradas. Por otra parte, mediante el análisis MDS fue posible

evidenciar que los caracteres de color y tipo de grano, y tamaño de espiga, son características diferenciales entre las subpoblaciones.

Palabras clave: marcadores moleculares, SNPs, estructura poblacional, grupos heteróticos.

Abstract

In plant breeding programs for hybrids development, knowledge about genetic and phenotypic diversity of the program available germplasm and heterotic grouping is very important since it is the starting point of breeding strategies. Molecular markers can be used in heterotic grouping, allowing a huge number of inbred lines classification, and establishing different genotypes grouping based on genetic distances. The aim of the present study was determining the population structure and heterotic groups in a 66 tropical inbred lines population from the Semillas Valle S.A. maize breeding program from SNP molecular markers. Lines were genotyped through the Illumina Maize50K SNP BeadChip, finding 12.209 informative SNPs, which allow the evaluation of genetic diversity and population structure from a principal components analysis and the Bayesian model MCMC, implemented in the STRUCTURE software. Additionally, a multidimensional scaling analysis (MDS) was made from the phenotypic data of the genotypes. This technique can be useful in the phenotypic diversity description in breeding programs. Three subpopulations were identified with F_{st} values from 0,0708 to 0,4447. On the other hand, through the MDS analysis was identify grain color, grain texture, and tassel size as divergent characteristics between the subpopulations.

Key words: molecular markers, SNP, population structure, heterotic grouping.

2.2 Introducción

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN con una ubicación particular en un cromosoma que puede estar asociada a la expresión de un rasgo particular. Se describen como una variación, que puede estar asociada a mutaciones o alteraciones en el genoma del individuo (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Los marcadores moleculares pueden ser secuencias cortas de ADN como los RFLPs, AFLPs, Secuencias

Repetitivas Cortas (SSR) o la variación en un único par de bases (Polimorfismo de Nucleótido Simple, SNP) (Al-samarai & Al-Kazaz, 2015). Los SNPs son posiciones únicas de un par de bases en el ADN genómico, donde se presentan bases diferentes (o alelos) entre los individuos de una población determinada, donde la frecuencia del alelo menor tiene una abundancia del 1% o mayor. Los SNPs son generalmente bialélicos, aunque en algunos casos pueden ser tri- o tetra-alélicos (Pereira & Gusmão, 2013). La frecuencia en la que se observan variaciones de una única base en el ADN genómico es variable de acuerdo con la especie. Ching et al., (2002) a partir del análisis de 36 líneas endocriadas de maíz, reportaron una frecuencia de cambios en nucleótidos alta, con un promedio de un polimorfismo por cada 31 pb en regiones no codificantes y un polimorfismo por cada 124 pb en regiones codificantes.

En el mejoramiento genético de híbridos de maíz, conocer las relaciones genéticas entre las líneas endocriadas permite organizar el germoplasma y agruparlo de acuerdo con las estimaciones de similaridad genética y asignación de grupos heteróticos (van Inghelandt et al., 2010). Los marcadores moleculares constituyen una de las metodologías en la determinación de grupos heteróticos que permite caracterizar un gran número de líneas endocriadas y establecer distintas agrupaciones de genotipos con base en distancias genéticas, incrementando la eficiencia del mejoramiento de híbridos (Reif et al., 2003; Richard et al., 2016). Anteriormente, los mejoradores asignaban líneas endocriadas a grupos diferentes con base en cruzamientos de prueba, pedigrís y rasgos morfológicos.

Sin embargo, es difícil asignar grupos definitivos con base en información empírica únicamente, particularmente para líneas que tienen bases filogenéticas similares. Se han realizado diversos estudios a partir de líneas endocriadas de maíz de diferentes orígenes, usando marcadores moleculares de tipo SSRs y SNP, donde se ha establecido la diversidad genética, la estructura poblacional y se clasificaron en grupos heteróticos (Liu et al., 2003; Richard et al., 2016). En general, los resultados obtenidos en estos ensayos son consistentes con la información de pedigrí de las líneas evaluadas (Liu et al., 2003). Adicionalmente, se ha reportado que las distancias genéticas basadas en SNP están altamente correlacionadas con el rendimiento del grano y la habilidad combinatoria específica, en concordancia con reportes previos de otros autores (Richard et al., 2016).

Actualmente, la diversidad genética presente en el germoplasma del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. solo ha sido estudiada a partir de variables morfo-agronómicas evaluadas en ensayos de caracterización de líneas parentales, cuya expresión está afectada por las condiciones ambientales, consumen bastante tiempo y labores, requieren poblaciones grandes y no cubren todo el genoma (Al-Naggar et al., 2020), y no se cuenta con información de la diversidad genómica. Por tanto, los marcadores moleculares podrían proveer información complementaria acerca de la diversidad presente en el genoma de las líneas parentales evaluadas. Considerando la importancia de conocer la diversidad presente en el germoplasma, la estructura poblacional y los grupos heteróticos para los programas de mejoramiento, y la utilidad de los marcadores moleculares y el fenotipo en la determinación de los mismos, el objetivo del presente estudio fue determinar la estructura poblacional y los grupos heteróticos en una colección de 66 líneas endocriadas de maíz de origen tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. a partir de marcadores moleculares tipo SNP.

2.3 Metodología

2.3.1 Secuenciación de las líneas parentales

Con el fin de caracterizar genéticamente los materiales, 66 líneas del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. fueron seleccionadas con base en su participación en la formación de híbridos experimentales de la compañía, eligiendo las líneas con mayor número de participaciones entre 2013 y 2017. Adicionalmente, 16 líneas parentales de híbridos con rendimientos y sanidad superiores a los testigos en los ensayos de adaptación fueron secuenciadas por duplicado, para un total de 82 secuencias correspondientes a 47 líneas amarillas y 35 líneas blancas. La genotipificación se realizó mediante el arreglo de genotipificación MaizeSNP50 BeadChip que permite evaluar hasta 56,110 SNPs (Q. Li et al., 2012), por genotipo y permite un cubrimiento de 451 marcadores asociados a genes conocidos y rasgos de importancia agronómica (Xu et al., 2017). Para ello, muestras de semillas fueron enviadas al proveedor Eurofins BioDiagnostics para la extracción de ADN y su genotipificación.

2.3.2 Análisis de diversidad genética

Se seleccionó la fracción de SNPs informativos (segregantes), los SNPs con una frecuencia de alelo menor (MFA) >0.05 y los marcadores con datos faltantes en menos del 20% de la población, después de realizar las imputaciones plausibles en la población, usando el software NGSEP (v. 4.1.0.) (Duitama et al., 2014).

Los datos genotípicos curados, se utilizaron para realizar los análisis de diversidad genética. La matriz de SNPs se utilizó para evaluar la estructura genética en la población de líneas por medio de análisis de componentes principales (PCA) empleando el software TASSEL (v. 5.2.73) (Bradbury et al., 2007), y posteriormente se realizó una gráfica de tres dimensiones implementando la herramienta XLSTAT (v. 2018) (Addinsoft) para observar gráficamente la distribución de los grupos asignando colores a los puntos de acuerdo con el color del grano. Adicionalmente, se realizó una gráfica en tres dimensiones donde los puntos fueron coloreados de acuerdo con el origen de las líneas. La estructura de la población también fue estimada usando un método de asignación poblacional basado en un modelo Bayesiano de Cadenas de Markov Montecarlo (MCMC) implementando el modelo de frecuencias alélicas independientes en el software STRUCTURE (v. 2.3.4). Se realizaron 10 corridas para cada número de poblaciones (k) establecido de 1 a 10. El tiempo de calentamiento y el número de replicaciones de MCMC se fijaron en 10.000 para cada ejecución. El valor K más probable fue determinado con la herramienta en línea Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) utilizando la probabilidad logarítmica de los datos $[\ln P(D)]$ y delta K (ΔK) en función de la tasa de cambio en $[\ln P(D)]$ entre valores K sucesivos. Adicionalmente, se calculó el estadístico F_{ST} como medida de la heterogeneidad de la población y el grado de separación que ha ocurrido dentro de la población. A partir de los grupos definidos en STRUCTURE se calcularon los valores de F_{ST} entre los pares de grupos usando las librerías Hierfstat (v.0.5–11) (Weir & Goudet, 2017) y Adegenet (v.1.3-1) (Jombart & Ahmed, 2011) en R, así como la heterozigosidad observada (H_o), la diversidad genética promedio (H_s), y el índice de fijación F_{IS} para cada subpoblación. También se construyó un árbol de unión de vecinos no enraizado (unrooted neighbor-joining tree) en la herramienta en línea iTol (v.5) (Letunic & Bork, 2021), con base en la matriz de distancias obtenida con TASSEL (v. 5.2.73) (Bradbury et al., 2007), que calcula la distancia como $1 -$ similitud de Identidad por estado (IBS, por sus siglas en inglés, Identity by State), con

IBS definido como la probabilidad de que los alelos extraídos al azar de dos individuos sean iguales en el mismo locus.

2.3.3 Caracterización fenotípica de líneas endocriadas

Las características fenotípicas de las líneas parentales fueron tomadas durante varios semestres consecutivos, como parte del registro documental del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A. El promedio de los caracteres cuantitativos y la moda de los caracteres cualitativos se tomaron como descriptores de cada una de las líneas con el fin de explorar la relación existente entre los datos fenotípicos de las líneas y la estructura genética determinada a partir de SNPs (ver sección 2.3.4.). Las características evaluadas se detallan en la tabla 2-1.

Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza para los caracteres fenotípicos entre las subpoblaciones determinadas a partir del análisis de diversidad genética. Para determinar la importancia de los caracteres fenotípicos se realizó un análisis de componentes principales en el software estadístico R.

Tabla 2-1 Características fenotípicas evaluadas en las 82 líneas endocriadas de maíz de origen tropical.

VARIABLE	HERRAMIENTA	DÍAS*	DESCRIPCIÓN
DLP50%	Medición directa	50-65	Días a Liberación de Polen al 50%. Se anota la fecha cuando el 50% de las plantas liberan polen.
DEV50%	Medición directa	50-65	Días a estigmas visibles al 50%. Se anota la fecha cuando el 50% de las plantas presentan estigma receptivo.
Alpla	Medición directa	80	Altura de la planta en centímetros.
Almaz	Medición directa	80	Altura de la mazorca en centímetros. La medida se toma desde el suelo hasta la base de la mazorca cuando haya pasado la floración.
AnchoHoja	Medición directa	80	Ancho de la hoja o lámina foliar. Se mide en centímetros el ancho de la parte media de la hoja de la mazorca.
LongEspiga	Medición directa	80	Longitud total de la espiga, desde el último entrenudo hasta la punta de la espiga.
Diamtuza	Medición directa	120	Diámetro de la tuza medido en la zona media de la tuza, en milímetros con un calibrador digital.

Diammaz	Medición directa	120	Diámetro de la mazorca medido en la zona media de la tuza, en milímetros con un calibrador digital.
Longmaz	Medición directa	120	Longitud total de la mazorca medida en milímetros con un calibrador digital.
No. Hileras	Medición directa	120	Número de hileras por mazorca.
Granos/Hilera	Medición directa	120	Número de granos por hilera.
Tipogr	Medición directa	120	Tipo de grano (cristalino a harinoso) cosecha. La transformación a número se da de la siguiente manera: Harinoso= 4, semiharinoso=3, semicristalino=2 y cristalino =1
Colorgr	Medición directa	120	Color de grano en maíz amarillo cosecha. La transformación de categoría a número se da así: Rojo =4, Amarillo pálido=3, Amarillo normal=2, Naranja=1.
Peso100sem	Medición directa	130	índice de semillas. Peso de 100 semillas.

*Días después de siembra

2.3.4 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS) para variables fenotípicas

El análisis de escalamiento multidimensional o MDS, es un tipo de análisis multivariado que ha sido ampliamente utilizado para visualizar las relaciones ocultas entre los objetos en los datos (Borg & Groenen, 2005). El análisis MDS permite encontrar la configuración de puntos compatible con las relaciones dadas entre los individuos evaluados, resultando en la representación visual de las estructuras o relaciones en los datos originales (Chengsong & Jianming, 2009). Con el fin de identificar si las agrupaciones dadas por la estructura genética corresponden con algún fenotipo en particular, primero se calculó a partir de la matriz de datos SNPs, una matriz de distancia Euclidiana entre todos los pares de individuos con la función `dist` del paquete `stats` (versión 3.62) en R. Posteriormente, se usó esta matriz de distancias genéticas para un MDS con la función `cmdscale` de este mismo paquete. Los resultados del MDS se visualizaron en un gráfico de dos dimensiones generado con la función `plot` del paquete R. Posteriormente, sobre el gráfico de dos dimensiones se visualizaron, por colores, diferentes rasgos fenotípicos registrados en los individuos para evaluar si los grupos genéticos identificados por MDS tienen alguna correspondencia con los rasgos fenotípicos. Para esto se usó el paquete `ggplot2` (V3.3.3; Wickham, 2016). Los rasgos fenotípicos analizados fueron: días a

liberación de polen al 50%, días a estigmas visibles al 50%, altura de planta, altura de mazorca, longitud de mazorca, diámetro de tuza, número de hileras por mazorca, número de granos por hilera, ancho de hoja, longitud de espiga, color de grano, tipo de grano, peso de 100 semillas o índice de semilla.

2.4 Resultados

2.4.1 Marcadores tipo SNP y análisis de estructura poblacional.

A partir del chip de Illumina MaizeSNP50 BeadChip se observaron un total de 55.542 SNPs en las 82 muestras evaluadas. Luego de curar los datos, 12.209 SNPs resultaron ser informativos para el análisis de estructura poblacional, presentando un MAF mínimo de 0.05 y menos del 20% de datos perdidos.

A partir de las distancias genéticas de Nei (1972) se realizó un análisis de coordenadas principales con el fin de ilustrar los ejes principales de la variabilidad entre las líneas evaluadas, plasmándola en una ordenación espacial (Fig. 2-1). Las tres primeras coordenadas principales resultantes del análisis explicaron el 22.17% de la variabilidad genética entre las subpoblaciones. Los componentes uno, dos y tres presentaron unos porcentajes de 14.57%, 4.0% y 3.61%, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos se estableció una separación entre poblaciones, observando tres grupos claramente diferenciados en la representación gráfica. Con el fin de establecer si la separación de los grupos coincidía con el color de grano, se asignaron colores de acuerdo con esta característica, donde fue posible apreciar que el grupo 2 está compuesto por genotipos tanto blancos como amarillos, mientras que los grupos 1 y 3 se componen de un único color de grano, con genotipos de color amarillo y blanco, respectivamente (Fig. 2-1). Adicionalmente, se realizó una gráfica donde se asignaron colores de acuerdo con el origen de las líneas, definido a partir de la información de procedencia y pedigrí del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A., para observar su distribución en la ordenación, y observar gráficamente si las agrupaciones de puntos corresponden con los orígenes de las líneas (Fig. 2-2). Así, en la figura 2-2 se observó que el grupo 2 está compuesto por líneas de diferentes orígenes, que corresponden a Centro América principalmente, África y algunos de Suramérica, el grupo 1 está compuesto por materiales de origen asiático principalmente y un genotipo de centro América, y el grupo 3 está compuesto únicamente por materiales de Suramérica.

Se realizó un análisis de estructura poblacional utilizando el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Con el fin de elegir el valor K óptimo a partir de la metodología propuesta por Evanno et al. (2005), se graficó el número de clústeres (K) con el delta K (ΔK), donde se evidenció un pico agudo en K=3 y otro en K=7 (Fig. 2-3), presentando valores de ΔK de 124.29 y 126.27, respectivamente. Al visualizar el diagrama de barras en Structure, la diferenciación entre las poblaciones con K=7 no es clara, por tanto, dada la utilidad en procesos de mejoramiento, se seleccionó como valor óptimo K=3. El valor K óptimo indica que tres subpoblaciones tienen una alta probabilidad para el agrupamiento de la población, y cada subpoblación consistió en 20, 47 y 15 genotipos, respectivamente (Fig. 2-3 y Tabla 2-2). Adicionalmente, la heterocigosidad esperada indica que la población 2 corresponde al grupo más diverso con un valor de H_e de 0,3572, siendo este el grupo con mayor número de genotipos. La clasificación de los genotipos, en general, corresponde con los tres grupos observados en el análisis de coordenadas principales, con el primer grupo compuesto por 19 genotipos, el segundo por 52 genotipos y el tercero por 11 genotipos, de acuerdo con la representación gráfica. Adicionalmente, los resultados de STRUCTURE permiten estimar el índice de fijación (F_{ST}) para cada una de las subpoblaciones, estimando un valor de F_{ST} para las poblaciones 1, 2 y 3 de 0.4301, 0.0705 y 0.4447 para cada uno, respectivamente, mientras que el valor de alfa promedio fue 0.1534 (Tabla 2-3).

La divergencia de la frecuencia alélica presenta valores en un rango entre 0.0845 y 0.1418. La diferenciación genética entre las poblaciones fue estadísticamente diferente de cero ($P < 0,05$), con un valor de $F_{ST} = 0.0870$, con un intervalo de confianza de 0.1279 a 0.1349 para las subpoblaciones 1 y 2, un valor de $F_{ST} = 0.1418$, con un intervalo de confianza de 0.2960 a 0.3088 para las subpoblaciones 1 y 2, y un valor de $F_{ST} = 0.0845$, con un intervalo de confianza de 0.1587 a 0.1667, siendo la subpoblación 3 la que presenta mayor diferenciación (Tablas 2-4 y 2-5). Adicionalmente, se presentó un valor de F_{ST} global alto de 0.17. Por otra parte, los valores para diversidad genética promedio (H_S) para las tres subpoblaciones son relativamente altos, 0.291, 0.367 y 0.248, respectivamente, mientras que los valores de heterocigosidad observada (H_O), 0.098, 0.027 y 0.073, respectivamente, son bajos lo cual corresponde con líneas homocigotas, así como los valores altos de F_{IS} (Tabla 2-6).

También se construyó un árbol filogenético de unión de vecinos (Neighbor-joining tree) sin raíz, para representar gráficamente las agrupaciones y las distancias genéticas dentro de la población, indicando las subpoblaciones 1, 2 y 3, con los colores rojo, verde y azul, respectivamente (Fig. 2-4).

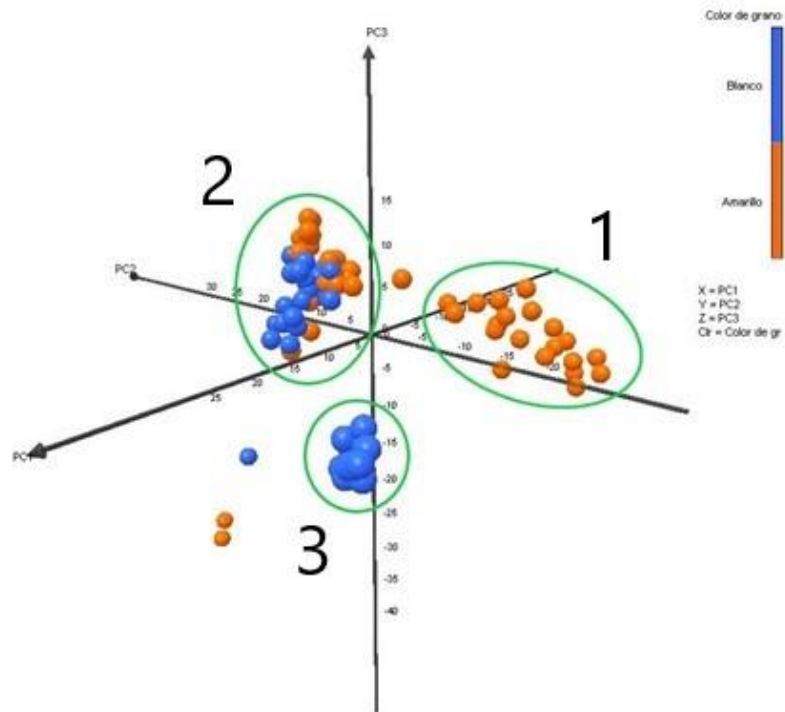


Figura 2-1. Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al color de grano de los genotipos de acuerdo con la caracterización fenotípica.

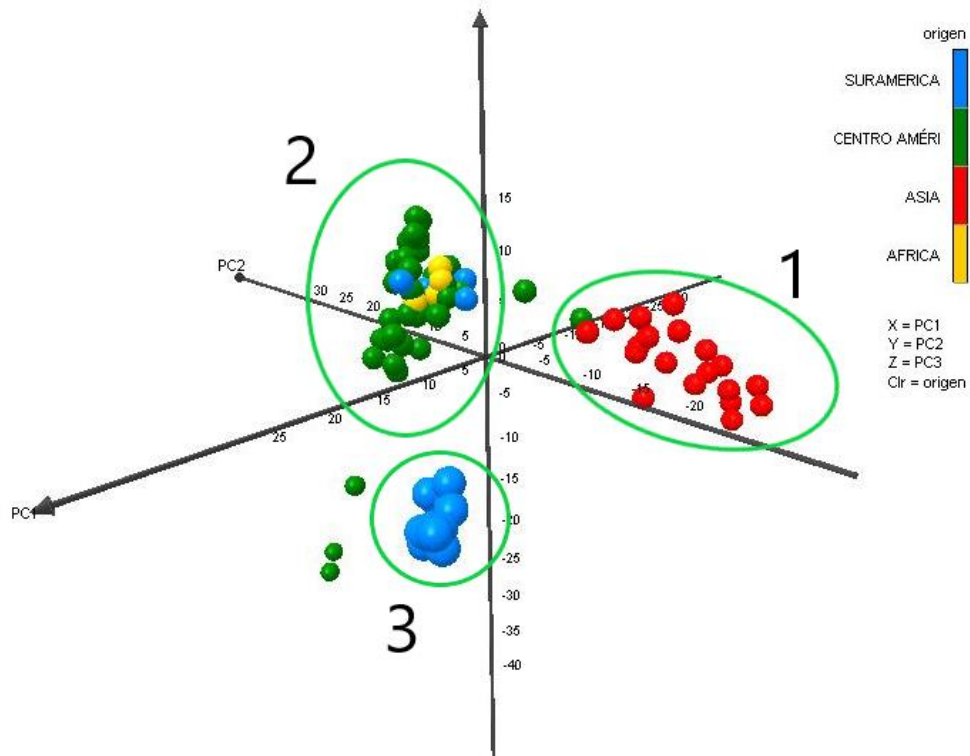


Figura 2-2 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al origen de los genotipos de acuerdo con la información del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A.

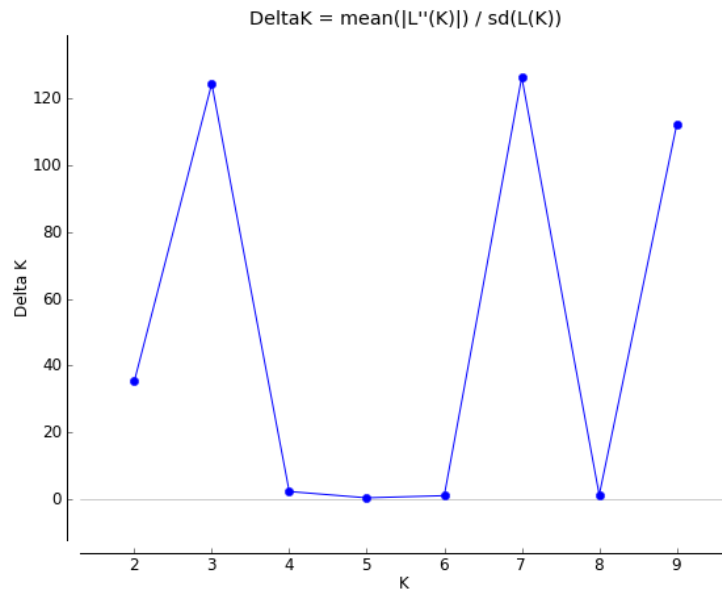


Figura 2-3 Delta K (Δ) para diferente número de subpoblaciones (K).

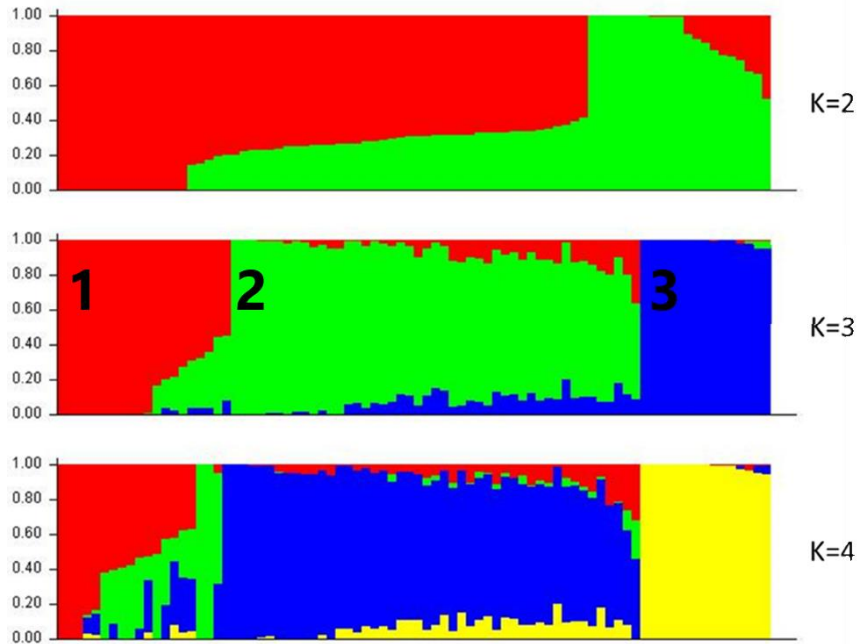


Figura 2-4 Estructura poblacional estimada de 82 líneas endocriadas de maíz tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. Diferentes colores indican la agrupación en una subpoblación diferente.

Tabla 2-2 Resultados de STRUCTURE para la proporción de genotipos inferidos en cada clúster, Heterocigosidad esperada (H_e) y número de genotipos asignados para cada población.

Población	Clústeres inferidos	H_e	No. De genotipos
Pob 1	0.250	0.2548	20
Pob 2	0.525	0.3572	47
Pob 3	0.225	0.2438	15

Tabla 2-3 Valores promedio de F_{ST1} , F_{ST2} , F_{ST3} inferidos de la aproximación basada en el modelo.

Población	Valor F_{ST}
Pob 1	0.4301
Pob 2	0.0705
Pob 3	0.4447
Valor promedio de alfa	0.1534

Tabla 2-4 Divergencia de frecuencia alélica entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.

Población	Pob 1	Pob 2	Pob 3
Pob 1	-	0.0870*	0.1418*
Pob 2	0.0870	-	0.0845*
Pob 3	0.1418	0.0845	-

* F_{ST} significativamente diferente de 0 ($P < 0.05$).

Tabla 2-5 Intervalos de confianza superior e inferior para los F_{ST} calculados entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.

Población	Pob 1	Pob 2	Pob 3
Pob 1	-	0.1349	0.3088
Pob 2	0.1279	-	0.1667
Pob 3	0.2960	0.1587	-

Límite superior por encima de la diagonal. Límite inferior por debajo de la diagonal.

Tabla 2-6 Diversidad genética promedio, heterocigosidad observada e índice de fijación para las subpoblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.

Población	H_S	H_O	F_{IS}
Pob 1	0,291	0.098	0,590
Pob 2	0,367	0.027	0,917
Pob 3	0.248	0.073	0,683

H_S = diversidad genética promedio; H_O = heterocigosidad observada; F_{IS} = índice de fijación.

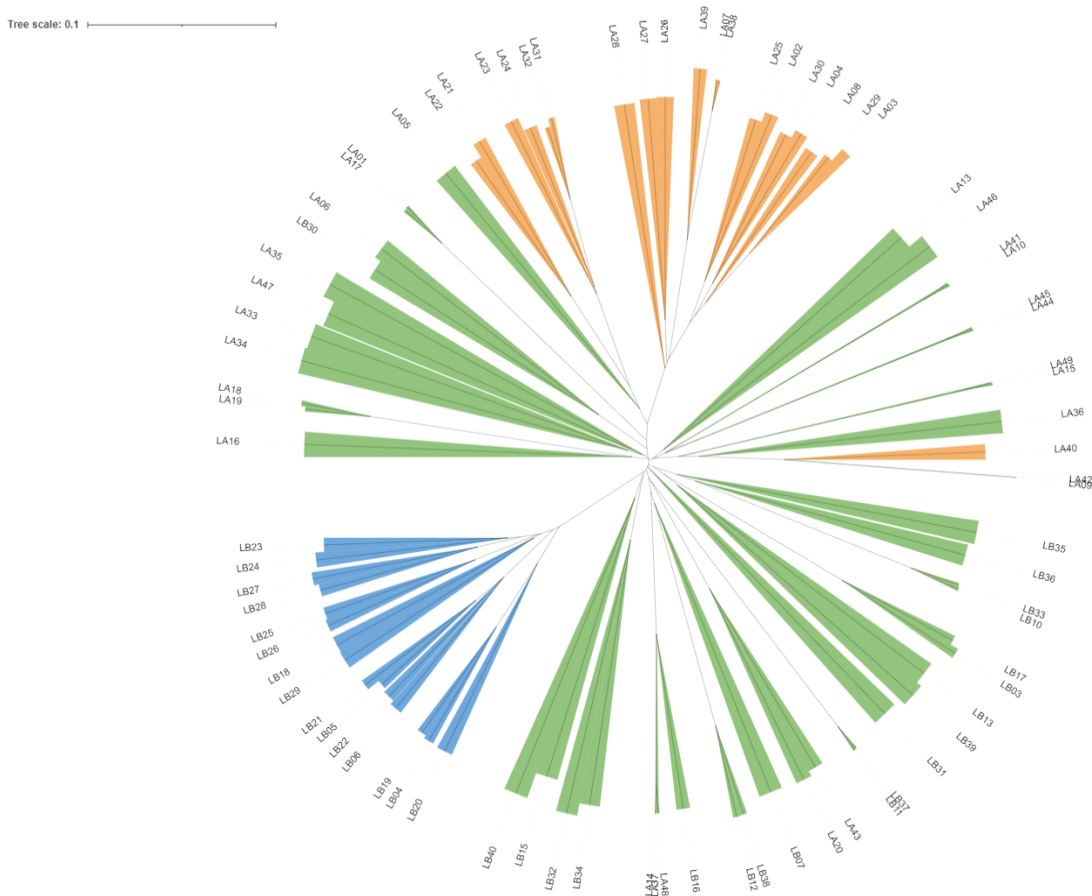


Figura 2-5 Árbol filogenético de unión de vecinos no enraizado basado en la matriz de distancias genéticas, representando las tres subpoblaciones determinadas a partir de STRUCTURE para un grupo de 82 líneas endocriadas de maíz tropical.

2.4.2 Análisis de varianza y componentes principales

En las tablas 2-7 y 2-8 se presenta el análisis de varianza para las 14 variables fenotípicas evaluadas en las tres subpoblaciones determinadas a partir del análisis de estructura poblacional. De acuerdo con el análisis de varianza, solamente los caracteres Ancho de hoja, Longitud de espiga y color de grano presentan diferencias estadísticas significativas entre las 3 subpoblaciones.

Tabla 2-7 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas DLP50, DEV50, Alpla, Almaz, AnchoHoja, LongEspiga y Diamtuza

	Df	DLP50	DEV50	Alpla	Almaz	AnchoHoja	LongEspiga	Diamtuza
Población	1	1.42 ns	0.77 ns	239.32 ns	644.19 ns	14.30***	349.37**	0.42 ns
Residual	80	5.77	5.76	416.18	214.9	1.18	33.11	1.31

** Diferencias estadísticas significativas, $P < 0.01$. *** Diferencias estadísticas altamente significativas, $P < 0.001$. ns Diferencias estadísticas no significativas. DLP50 = días a liberación de polen al 50%; DEV50 = días a estigmas visibles al 50%; Alpla= altura de planta; Almaz= altura de mazorca; AnchoHoja = ancho de la lámina foliar en cm; LongEspiga = longitud de la espiga en cm; Diamtuza = diámetro de tuza en mm.

Tabla 2-8 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas Diammaz, Longmaz, No. Hileras, Granos/hilera, Tipogr, Color gr y Peso100sem

	Df	Diammaz	Longmaz	No.Hileras	Granos/ hilera	Tipogr	Colorgr	Peso 100sem
Población	1	2.97 ns	96.38 ns	49.61 ns	490.95 ns	0.25 ns	30.30**	374.02 ns
Residual	80	3.63	44.63	48.39	173.48	1.74	1.50	197.66

** Diferencias estadísticas significativas, $P < 0.01$. *** Diferencias estadísticas altamente significativas, $P < 0.001$. ns Diferencias estadísticas no significativas. Diammaz = diámetro de mazorca en mm; Longmaz = longitud de mazorca en mm; No. Hileras = número de hileras por mazorca, Granos/hilera = número de granos por hilera; Tipogr = tipo o textura de grano; Colorgr = color de grano; Peso100sem = índice de semilla calculado como peso de 100 semillas.

Por otra parte, en el análisis de componentes principales se determinó que los primero cinco componentes explicaron el 89,9% de la variación observada. Estos cinco componentes explican el 47.8%, 16.0%, 10.5%, 9.22% y 6.27% de la variación, respectivamente. El componente principal 1 está compuesto por variables de la mazorca como diámetro de tuza y de mazorca, longitud de mazorca, número de hileras, número de granos por hilera, color y tipo de grano, y peso de 100 semillas. El segundo componente está compuesto por las variables de floración, días a liberación de polen al 50% y días a estigmas visibles al 50%, el tercer componente está compuesto por altura de mazorca, el cuarto por altura de planta, y ancho de hoja, y el quinto está compuesto por longitud de mazorca (Tabla 2-8).

Tabla 2-9 Componentes principales para 14 características fenotípicas en 66 líneas de maíz de origen tropical clasificadas en 3 subpoblaciones a partir de SNPs.

Carácter	Componentes principales				
	1	2	3	4	5
DLP50	0.17	0.82	0.46	0.05	0.14
DEV50	0.06	0.83	0.46	0.17	0.08
Alpla	0.12	-0.57	0.32	0.65	0.14
Almaz	0.17	-0.47	0.64	0.40	-0.25
AnchoHoja	0.19	-0.41	0.37	-0.54	0.45
LongEspiga	0.11	0.10	-0.51	0.55	0.61
Diamtuza	0.97	0.01	-0.02	-0.02	-0.03
Diammaz	0.99	-0.05	-0.02	-0.05	0.00
Longmaz	0.98	-0.08	-0.01	-0.07	-0.02
No.Hileras	0.97	-0.05	-0.07	-0.06	-0.01
Granos.hilera	0.93	-0.08	0.00	-0.03	0.06
Tipogr	0.83	0.24	0.07	0.03	0.08
Colorgr	0.53	0.28	-0.36	0.27	-0.42
Peso100sem	0.96	-0.10	-0.01	-0.08	-0.01
Varianza	6.70	2.24	1.47	1.29	0.88
%Varianza	47.89	16.03	10.50	9.22	6.27

DLP50 = días a liberación de polen al 50%; DEV50 = días a estigmas visibles al 50%; Alpla= altura de planta; Almaz= altura de mazorca; AnchoHoja = ancho de la lámina foliar en cm; LongEspiga = longitud de la espiga en cm; Diamtuza = diámetro de tuza en mm; Diammaz = diámetro de mazorca en mm; Longmaz = longitud de mazorca en mm; No. Hileras = número de hileras por mazorca, Granos/hilera = número de granos por hilera; Tipogr = tipo o textura de grano; Colorgr = color de grano; Peso100sem = índice de semilla calculado como peso de 100 semillas.

2.4.3 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS).

A partir de la matriz de distancias Euclidianas y la matriz de datos fenotípicos se realizaron gráficos MDS en dos dimensiones, donde una escala de color representa la variación del rasgo en los genotipos evaluados. En todas las variables evaluadas, excepto en longitud de espiga, tipo y color de grano, se evidencia que en los grupos genéticos identificados se presenta alta variabilidad, por lo cual no se puede asociar la agrupación con un fenotipo en particular (Figuras 2-6 y 2-7). En la variable longitud de espiga, se observa que la subpoblación 3 presenta, en general, espigas más pequeñas en todos los genotipos, respecto a las otras dos subpoblaciones (Figura 2-7b).

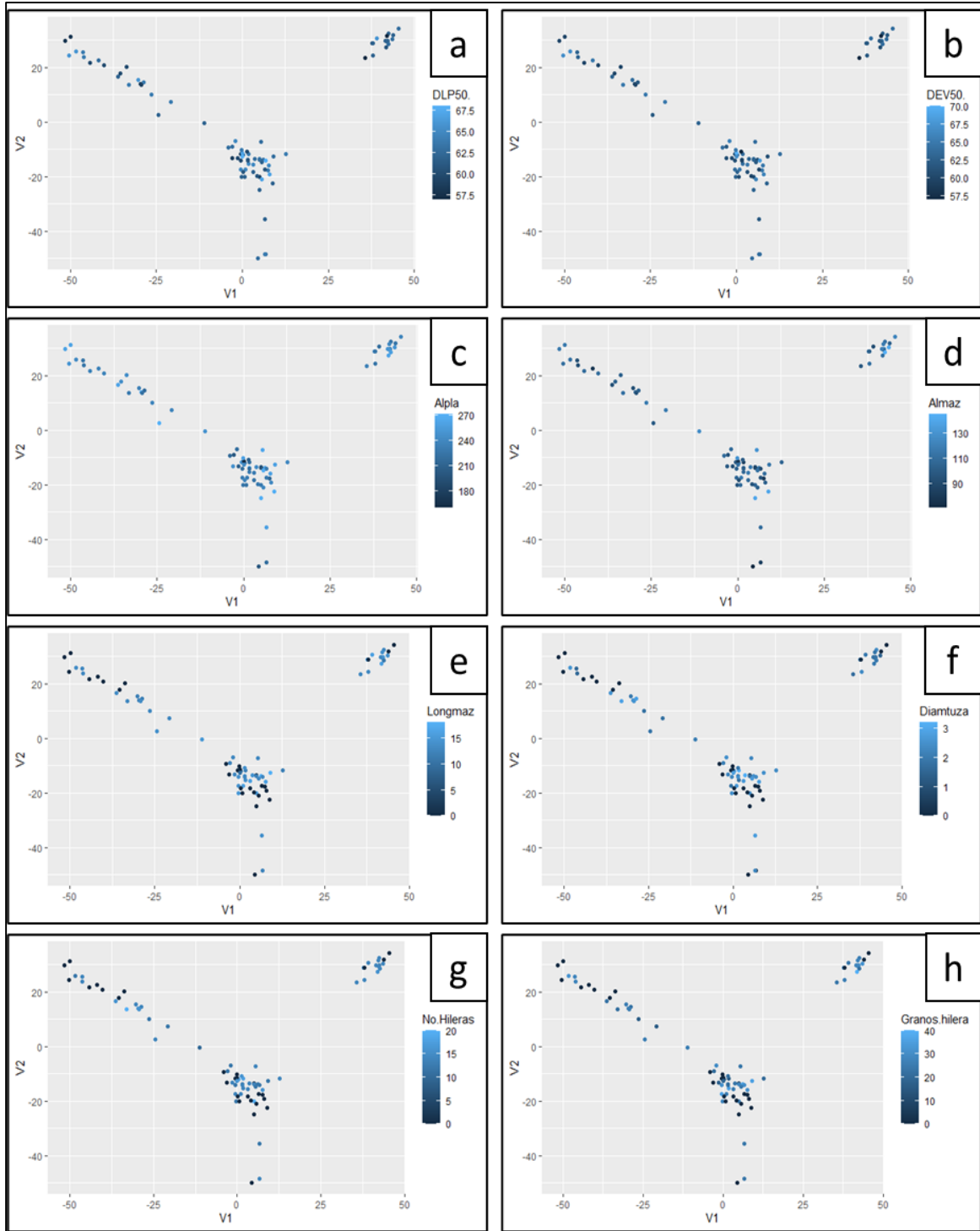


Figura 2-6. Gráficas MDS para las variables fenotípicas evaluadas. a) Días a liberación de polen al 50%, b) Días a estigmas visibles al 50%, c) Altura de planta, d) Altura de mazorca, e) Longitud de mazorca, f) Diámetro de tuza, g) Número de hileras por mazorca, h) Número de granos por hilera. Colores más oscuros indican valores inferiores y colores más claros valores superiores.

Adicionalmente, en la variable color de grano, la subpoblación 3 presenta una clasificación de color 0, que corresponde a genotipos de color blanco, mientras que en los otros grupos se presenta mezcla de colores entre amarillos y blanco (Figura 2-7c). Así mismo, para la variable tipo de grano, también se observa que la subpoblación 3 presenta mayor cantidad de genotipos con valores 0 y 1, que corresponden a tipos de grano cristalinos (Figura 2-6d).

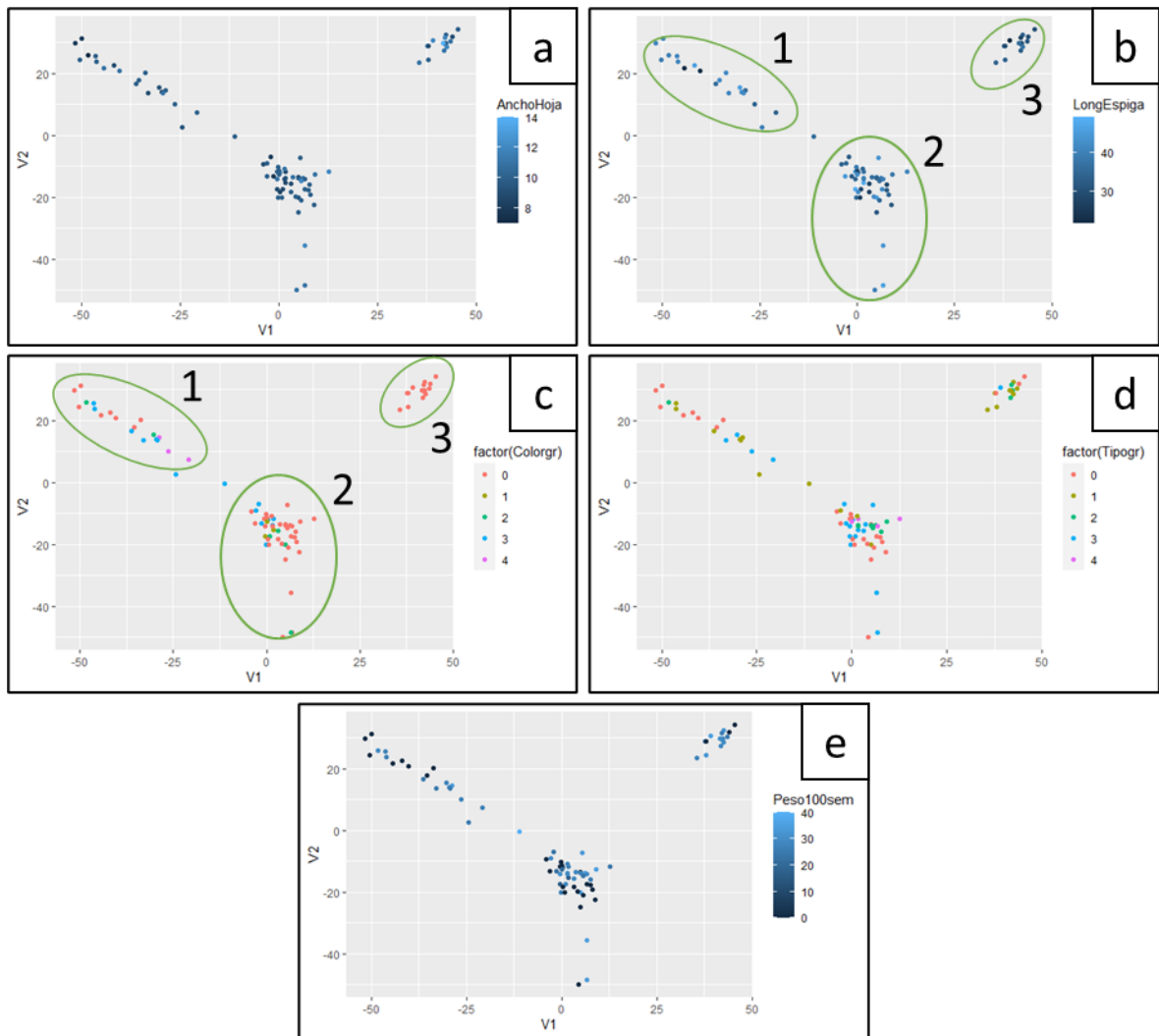


Figura 2-7 Gráficas MDS para las variables fenotípicas evaluadas: a) ancho de hoja, b) Longitud de espiga, c) Color de grano, donde: 0= blanco, 1= naranja, 2= naranja claro, 3= amarillo, 4= amarillo claro; d) Tipo de grano, donde: 0= cristalino, 1= semicristalino, 2= intermedio, 3= semiharinoso, 4= harinoso; e) Peso de 100 semillas o índice de semilla.

2.5 Discusión

El estudio de los marcadores tipo SNP permitió identificar tres subpoblaciones ($K=3$) en las 82 líneas endocriadas evaluadas, en los que fue posible observar que la subpoblación 1 está conformada por líneas de grano color amarillo, la subpoblación 2, donde se agrupa el mayor número de líneas, está conformada por líneas de ambos colores de grano, y la subpoblación 3 está conformada por líneas solamente de color de grano blanco. Adicionalmente, también se observó que en la subpoblación 1 se agruparon predominantemente líneas de origen asiático, en la subpoblación 2 se agruparon líneas de Centroamérica, Suramérica y África, y en la subpoblación 3 se agruparon líneas de Suramérica. Este resultado es similar al obtenido por Adu et al. (2019), quienes observaron el mismo número de subpoblaciones en una muestra de 94 líneas de maíz tropicales, indicando que el análisis a partir de SNPs permitió asignar líneas endocriadas en grupos heteróticos, donde individuos con antecedentes genéticos similares fueron clasificados en la misma subpoblación. Adicionalmente, las subpoblaciones 1 y 2 reportadas por Adu et al. (2019), estuvieron compuestas por genotipos con endospermo de color amarillo, mientras que la tercera subpoblación fue conformada por genotipos predominantemente de color blanco y en menor proporción genotipos con endospermo amarillo, siendo la subpoblación con más líneas (34), y presentando la mayor diversidad con líneas de seis orígenes diferentes. Por otra parte, Zhang et al. (2016), realizaron un estudio de estructura poblacional y diversidad genética en 362 líneas endocriadas de maíces de diferentes orígenes, realizando la separación de los grupos genéticos a partir de SNPs mediante un análisis con el software STRUCTURE, donde fue posible identificar hasta 6 subgrupos basados en el valor K , concluyendo que la separación de los grupos es adecuada ya que concuerdan con la información de la fuente del germoplasma evaluado (Zhang et al., 2016). Los resultados obtenidos permiten clasificar las líneas endocriadas en grupos heteróticos a partir de la población evaluada, demostrando una vez más la efectividad del uso de marcadores tipo SNP en esta clasificación (Adu et al., 2019; Stanley et al., 2020; Zhang et al., 2016). La clasificación de las líneas en grupos heteróticos a partir de análisis de coordenadas principales o clúster puede causar dudas ya que generalmente las primeras tres coordenadas pueden no contener gran parte de la variación (Pinto et al., 2003). En este estudio las primeras tres coordenadas sólo representan el 22% de la variabilidad de la población. Sin embargo, el análisis de coordenadas principales junto con el análisis realizado en STRUCTURE y la

representación gráfica de las subpoblaciones, brinda mayor confianza en la clasificación establecida.

La evaluación de los componentes principales muestra claramente la existencia de una estructura poblacional en el germoplasma evaluado, con una diferenciación moderada. Nyaligwa et al. (2015), evaluaron 79 líneas de maíz elite de diferentes orígenes geográficos, obtenidas del Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT), y otros institutos de investigación de África, donde encontraron bajos niveles de diferenciación entre las regiones de origen, lo cual fue atribuido al alto grado de endocria, conllevando a homogeneidad genética, y a la transferencia de genes, siendo 0.03 el valor más bajo observado. Sin embargo, otros autores reportan valores de F_{ST} superiores al evaluar líneas de maíz de diferentes orígenes, tal como Zhao et al., (2018), quienes evaluaron 344 líneas endocriadas de maíz, usadas en el mejoramiento de maíz para China, originarias de Estados Unidos y China, encontrando 8 grupos genéticos con valores de F_{ST} entre 0,319 y 0,512. También, Shu et al. (2021), evaluaron 490 líneas endocriadas de la colección de germoplasma del cinturón central maicero de China, encontrando 10 subgrupos diferenciados con valores de F_{ST} en un rango entre 0,209 y 0,346.

Los resultados han permitido identificar tres subpoblaciones diferenciadas, que, en general, corresponden al origen de las líneas. El análisis de la diferencia de frecuencias alélicas entre las poblaciones inferidas permite establecer mayor divergencia entre la subpoblación 1 (Asia) y la subpoblación 3 (Suramérica)(0.1418). Por otra parte, la subpoblación 2 (origen mixto: Centroamérica/Suramérica/África) presenta una divergencia significativa (<0.05) respecto a las subpoblaciones 1 y 3, sin embargo, valores pequeños indican una baja divergencia nucleotídica entre estas subpoblaciones (0.0870 y 0.0845, respectivamente) (Romay et al., 2013). Este constituye un resultado importante para ser usado como insumo en el planteamiento de las estrategias de mejoramiento, ya que será posible realizar cruzamientos entre los grupos divergentes, lo cual debe estar soportado por ensayos que permitan analizar la habilidad combinatoria entre los genotipos evaluados, con el fin de obtener híbridos de alto rendimiento explotando el vigor híbrido que presenta la especie, permitiendo el desarrollo de líneas mejoradas a partir de la diversidad existente en el germoplasma actual. Es posible que los resultados estén influenciados positivamente por la gran cantidad de marcadores

evaluados lo cual puede facilitar la interpretación de los resultados y la inferencia de la estructura poblacional (Adu et al., 2019).

El análisis de varianza indica que se presenta variabilidad fenotípica para los caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados en todos los grupos genéticos establecidos, con diferencias estadísticas altamente significativas en la variable ancho de hoja, y diferencias significativas en la longitud de espiga y color de grano, Lo cual es positivo para el programa de mejoramiento genético, ya que será posible seleccionar parentales que cumplan con las características del mercado objetivo.

El análisis de escalamiento multidimensional (MDS) es una técnica que permite establecer las relaciones fenotípicas en el germoplasma evaluado a partir de una matriz de distancias genéticas (da Silva et al., 2014). Un factor importante en el éxito de los programas de mejoramiento genético es la evaluación de la diversidad existente en el germoplasma del que se dispone, con el fin de determinar el potencial de los materiales para el desarrollo de productos adaptados a los requerimientos del mercado. Así, conocer las relaciones fenotípicas entre las líneas del banco de germoplasma será un indicador de la presencia de fuentes de rasgos de interés para el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético o la necesidad de encontrar nuevos recursos para alcanzar los objetivos del programa (Barroso et al., 2019). Algunos autores han reportado la utilidad de los análisis MDS para evaluar la diversidad dentro de una colección de accesiones e identificar los genotipos con mayor divergencia, tal como Barroso et al. (2019), quienes evaluaron la dispersión fenotípica de 25 accesiones de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) mediante un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (nMDS), basándose en la morfología de la semilla, indicando que esta técnica puede ser usada como complemento en los análisis de diversidad fenotípica en esta especie (Barroso et al., 2019). Por otra parte, da Silva et al. (2014), usaron el análisis MDS para caracterizar la dispersión fenotípica de 20 accesiones de Ajo (*Allium sativum* L.), logrando identificar cultivares con características divergentes de forma eficiente de acuerdo con la clasificación previa de subgrupos genéticos (A. R. da Silva et al., 2014).

Entre las variables fenotípicas evaluadas, la variable de longitud de espiga presenta un comportamiento diferencial entre los grupos genéticos establecidos, lo cual se aprecia en la gráfica del análisis MDS (Figura 2-4), en concordancia con el análisis de varianza. La morfología de la espiga puede ser un indicador del potencial de producción de polen de

un genotipo, lo cual es esencial en la formación adecuada de semillas, el rendimiento de grano, y para asegurar la pureza genética en la formación de semilla híbrida (Fonseca et al., 2003). Por tanto, la diferenciación en este carácter dentro de los grupos heteróticos puede ser de utilidad en la determinación del uso de los parentales para la formación de híbridos, ya que aquellos genotipos que presenten espigas pequeñas deberán ser usados preferiblemente como hembras, garantizando una adecuada obtención de semilla.

Por otra parte, los rasgos de color y tipo, o textura de grano, son caracteres de herencia compleja, ya que su expresión en el grano está determinada por la segregación de varios factores del endospermo (White, 1917). Lo anterior también deberá tenerse en consideración en el planteamiento de los posibles cruzamientos entre los grupos heteróticos definidos, de acuerdo con los caracteres de color y tipo de grano de los genotipos en cada uno de ellos.

2.6 Conclusiones

A partir de este estudio se ha demostrado la existencia de un grado importante de diversidad genética dentro de la colección de líneas endocriadas de origen tropical del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A. a partir de la evaluación de marcadores moleculares tipo SNP.

Las metodologías empleadas permitieron definir tres grupos genéticamente contrastantes, asociados a los diferentes orígenes del germoplasma, que son de gran utilidad en el establecimiento de las estrategias de mejoramiento del programa de investigación, permitiendo direccionar los cruzamientos de acuerdo con la heterosis esperada y las características fenotípicas de los genotipos en cada grupo, las cuales han presentado variabilidad significativa, haciendo más eficiente la formación, evaluación y selección de híbridos que cumplan con los requerimientos del mercado objetivo.

3. Capítulo 3: Comparación de las metodologías de clasificación de los patrones heteróticos: Dialelo y SNPs.

3.1 Resumen

Uno de los objetivos principales de los programas de mejoramiento genético de maíz es desarrollar líneas parentales endocriadas de alto valor genético que al ser cruzadas puedan producir híbridos con características agronómicas superiores. El desarrollo de híbridos de maíz parte del principio de heterosis. El conocimiento de la diversidad genética y la estructura poblacional es de gran importancia en los programas de mejoramiento de maíz ya que permite establecer estrategias para la obtención eficiente de híbridos de alto rendimiento a partir de parentales, clasificados en grupos heteróticos complementarios. En el presente estudio se establecerá la clasificación de líneas endocriadas en grupos heteróticos en la población de líneas élite del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A. La clasificación se realizó usando dos metodologías: a partir de datos genómicos empleando marcadores moleculares tipo SNP y datos de campo en 30 líneas endocriadas. Y partir de un ensayo de tipo dialelo donde participaron 30 parentales de estas líneas endocriadas. Mediante un análisis de clúster los marcadores moleculares permitieron identificar dos grupos heteróticos o subpoblaciones. Mientras que los resultados del dialelo permiten inferir que se presentan tres grupos. Sin embargo, la integración de las metodologías podría proveer más información respecto a los grupos heteróticos presentes en la población evaluada.

Palabras clave: análisis de Clúster, dialelo, grupos heteróticos, habilidad combinatoria específica, SNPs.

Abstract

One of the main objectives on the maize breeding programs is the development of parental inbred lines of high genetic value, that when crossed could produce new hybrids with improved agronomic characteristics. The development of maize hybrids relies on the principle of heterosis. Knowledge on genetic diversity and population structure is very important in maize breeding programs because it will allow the establishment of new strategies for the efficient obtention of high yielding hybrids from inbred parental lines, classified in complementary heterotic groups. In this study, we classified inbred lines into heterotic groups using SNP molecular markers, and field data of 30 lines from the Semillas Valle S.A. maize breeding program, and from field data of a diallel crossing essay where the 30 parental lines participated. From a cluster analysis based on molecular marker data, two heterotic groups or subpopulations were identified, while diallel results allowed us to infer three different groups. Nevertheless, the integration of both methodologies could provide additional information about the heterotic groups present in the population.

Key words: Cluster analysis, diallel, heterotic groups, Specific combine ability, SNP.

3.2 Introducción

La clasificación de grupos heteróticos es crucial para los programas de mejoramiento genético del maíz híbrido (*Zea mays* L.) (Fan et al., 2018), siendo la clave para tener una mayor eficiencia ya que permite reducir las probabilidades de evaluar híbridos con características indeseables (Richard et al., 2016). La eficiencia en la asignación de grupos heteróticos a las líneas endocriadas es necesario para obtener un patrón heterótico útil para el esquema de mejoramiento genético usado (Oyetunde et al., 2020).

Existen diversos métodos para clasificar líneas parentales en grupos heteróticos, incluyendo el uso de rasgos morfológicos, método de pedigrí, técnicas multivariadas, métodos genéticos incluyendo diseños de apareamientos, como los cruzamientos dialélicos y cruzamientos línea x probador, y el uso de marcadores moleculares (Olutayo Akinwale, 2021). Varios autores han reportado la eficiencia en la determinación del

patrón heterótico en una población a partir de datos fenotípicos y de datos genotípicos (Adu et al., 2019; Bidhendi et al., 2009; El-Badawy, 2013; Nardino et al., 2016; Paterniani et al., 2000; Richard et al., 2016; van Inghelandt et al., 2010). La habilidad combinatoria específica (HCE) para el rendimiento de grano y la habilidad combinatoria general (HCG) son usadas para clasificar líneas parentales en grupos heteróticos, sin embargo, el rendimiento de grano es un rasgo complejo y de baja heredabilidad, por lo cual puede ser necesario hacer análisis comparativos que permitan determinar la metodología más eficiente (Mahato et al., 2021). Otros autores han evaluado las dos metodologías en conjunto (marcadores moleculares y cruces dialélicos) para establecer la utilidad de cada una de ellas (Aguiar et al., 2008; Barata & Carena, 2006; Pinto et al., 2003). Diferentes estudios han probado la utilidad de los marcadores moleculares tipo SSR en la clasificación de grupos heteróticos, y han comparado los resultados obtenidos a partir de esta metodología y la clasificación a partir de datos fenotípicos, sin embargo, pocos estudios reportan el uso de SNPs y ensayos de dialelo en la determinación de grupos heteróticos. Por lo anterior, aplicar la metodología de clasificación de grupos heteróticos a partir de SNPs en comparación con los resultados obtenidos a partir de ensayos de tipo dialelo, que están basados en las habilidades combinatorias de las líneas evaluadas, puede proveer información importante acerca de la utilidad de estos marcadores en la determinación de grupos heteróticos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue comparar la consistencia de la clasificación de los patrones heteróticos definidos mediante ensayos de dialelo y marcadores moleculares de tipo SNP en líneas de maíz de origen tropical y su eficiencia en términos de tiempo, costos y asignación de genotipos.

3.3 Metodología

3.3.1 Determinación de grupos heteróticos a partir de ensayos tipo dialelo

En el ensayo se incluyeron 30 líneas élite del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A como parentales. Las líneas fueron seleccionadas por ser las líneas parentales con mayor cantidad de híbridos experimentales formados desde 2013. Con ayuda de la herramienta informática Semillas (v. 2018) (Semillas Valle S.A.), se programaron cruzamientos entre los 30 parentales, sin incluir los recíprocos, de acuerdo con el método

2 descrito por Griffing (1956), para un total de 435 cruzamientos, incluidos los 30 parentales $[(P(P+1))/2]$.

Los 435 híbridos sencillos fueron evaluados junto con 4 híbridos comerciales como testigos en un diseño de bloques aumentados. Los ensayos fueron llevados a cabo en dos semestres consecutivos, 2018A y 2018B, en dos localidades que correspondían a la finca Estambul, ubicada en el norte del Valle de Cauca, en el municipio de Roldanillo ($4^{\circ}27'05''N$ $76^{\circ}04'53''W$, 910 msnm), y al Centro Experimental de Semillas Valle S.A. ubicado en el centro del Valle del Cauca, en el municipio de El Cerrito ($3^{\circ}41'26.3''N$ $76^{\circ}18'35.7''W$, 992 msnm), con tres repeticiones por localidad. Cada unidad experimental consistió en dos surcos de 5 metros, con distanciamiento de 0.8 m entre surcos y callejones frontales y posteriores de 2 m y 0.8 m respectivamente. En cada una de las localidades se evaluaron los componentes de rendimiento y sanidad más importantes.

Los datos fueron analizados usando el software estadístico R mediante un análisis de varianza de acuerdo con el planteamiento del método 2 de Griffing (1956) que trabaja sólo con los datos de los padres y F1 directos. Adicionalmente, usando las fórmulas establecidas por Griffing (1956) se evaluó la HCG y HCE para cada progenitor. La determinación de grupos heteróticos se realizó aplicando la aproximación propuesta por Badu-Apraku et al. (2013), donde se clasifican las líneas con base en la HCG de múltiples rasgos (HGCAMT, por sus siglas en inglés, Heterotic grouping based on GCA of multiple traits). Se realizó una estandarización de los efectos de la HCG de los rasgos evaluados, para minimizar los efectos de las diferentes escalas de medición para cada rasgo (Badu-Apraku et al., 2013), se incluyeron las variables altura de planta (alpla), altura de mazorca (almaz), floración masculina (florm), floración femenina (florf), aspecto de mazorca (asmaz), color de grano (colorgr), tipo de grano (tipogr) y rendimiento de grano (rendim), para un total de 8 rasgos que presentaron significancia en los ambientes evaluados. Una vez estandarizados los valores, se realizó un análisis de clúster usando el método de Ward de varianza mínima usando el software estadístico R Studio (RStudio Team, 2022), y se construyó un dendograma basado en el agrupamiento (Ver Capítulo 1).

3.3.2 Determinación de grupos heteróticos a partir de marcadores moleculares

Las 30 líneas involucradas en el ensayo de dialelo fueron genotipificadas mediante el arreglo de Illumina MaizeSNP50 BeadChip que permite evaluar hasta 56,110 SNPs (Q. Li et al., 2012), por genotipo y permite un cubrimiento de 451 marcadores asociados a genes conocidos y rasgos de importancia agronómica (Xu et al., 2017). Para ello, muestras de semillas fueron enviadas al proveedor Eurofins BioDiagnostics para la extracción de ADN y su genotipificación.

Se seleccionó la fracción de SNPs informativos (segregantes), los SNPs con una frecuencia de alelo menor (MFA) >0.05 y los marcadores con datos faltantes en menos del 20% de la población, después de realizar las imputaciones plausibles en la población, usando el software NGSEP (v. 4.1.0.) (Duitama et al., 2014). Los datos genotípicos curados, se utilizaron para realizar los análisis de diversidad genética. La matriz de SNPs se utilizó para evaluar la estructura en la población de líneas por medio de análisis de componentes principales (PCA) empleando el software TASSEL (v. 5.2.73) (Bradbury et al., 2007), y posteriormente se realizó una gráfica de 3 dimensiones implementando la herramienta XLSTAT (v. 2018) (Addinsoft) para observar gráficamente la distribución de los grupos. La estructura de la población fue estimada usando un modelo Bayesiano de Cadenas de Márkov Montecarlo (MCMC) implementado en el software STRUCTURE (v. 2.3.4). Se realizaron 10 corridas para cada número de poblaciones (k) establecido de 1 a 10. El tiempo de calentamiento y el número de replicaciones de MCMC se fijaron en 10.000 para cada ejecución. El valor K más probable fue determinado con la herramienta en línea Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) utilizando la probabilidad logarítmica de los datos $[\ln P(D)]$ y delta K (ΔK) en función de la tasa de cambio en $[\ln P(D)]$ entre valores K sucesivos. A partir de los grupos definidos en STRUCTURE se calcularon los valores de F_{ST} entre los pares de grupos usando las librerías Hierfstat (v.0.5–11) (Weir & Goudet, 2017). Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza para los caracteres fenotípicos entre las subpoblaciones determinadas a partir del análisis de diversidad genética usando el software estadístico R (Ver Capítulo 2, Tabla 2-1).

3.3.3 Comparación de las metodologías evaluadas

Una vez establecidos los grupos heteróticos, se realizó una comparación de la asignación de genotipos en cada una de las metodologías propuestas, con el fin de establecer si hay coincidencia en la formación de grupos. La eficiencia del agrupamiento fue determinada como el porcentaje de líneas clasificadas de forma diferencial en cada metodología (Oyetunde et al., 2020). Adicionalmente, se realizó un análisis de costos y tiempo de desarrollo de los ensayos para establecer la eficiencia de cada una de las metodologías.

3.4 Resultados

3.4.1 Determinación de grupos heteróticos a partir de la habilidad combinatoria específica

El análisis de varianza fue obtenido por medio del aplicativo de Cimmyt AGD-R (Analysis of Genetic Designs with R for Windows. V.5.0. Rodríguez et al., 2015), para las variables de componentes de rendimiento, características de planta y sanidad, lo cual se discute al detalle en el capítulo 1 (ver Capítulo 1). En la tabla 1-5 se detallan los valores de habilidad combinatoria general para la variable rendimiento en los 30 parentales evaluados, los cuales se presentan organizados de acuerdo con la magnitud de la *HCG* y la habilidad combinatoria específica se presenta en la figura 1-1, que corresponde a la matriz de cruzamientos con el valor calculado de *HCE*, donde se muestra una escala de color de rojo a verde, que permite apreciar los valores negativos, cercanos a cero y positivos, respectivamente. Adicionalmente, los valores detallados se presentan en el Anexo 1 (Ver Capítulo 1).

Por otra parte, a partir de la metodología de HGCAMT, aplicando el método de agrupación jerárquica de Ward, que permite formar grupos mutuamente excluyentes con base en la similitud respecto a las características especificadas (Ward, 1963), se obtuvo el dendrograma presentando en la figura 3-1. De acuerdo con esta clasificación, se observan 3 grupos heteróticos, compuestos por 7, 14 y 9 líneas, respectivamente.

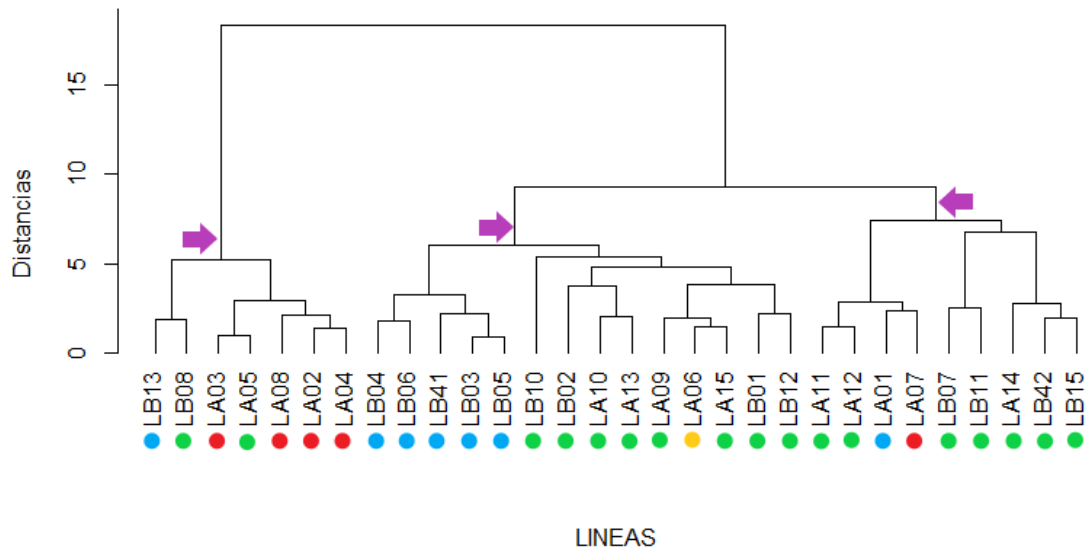


Figura 3-1 Dendrograma de 30 líneas de maíz de origen tropical construido a partir de los efectos de la HCG del rendimiento de grano y otros rasgos usando el análisis de clúster de mínima varianza de Ward. Los puntos de colores hacen referencia al origen de las líneas: azul= Suramérica; verde= Centroamérica; rojo= Asia; amarillo= África.

3.4.2 Determinación de grupos heteróticos a partir de marcadores tipo SNP y análisis de estructura poblacional.

A partir del chip de Illumina MaizeSNP50 BeadChip se observaron un total de 55.542 SNPs en los 30 genotipos evaluados. Una vez curados los datos, se obtuvieron 14.755 SNPs informativos para el análisis de estructura poblacional, presentando un MAF mínimo de 0.05 y menos del 20% de datos perdidos.

Se realizó un análisis de coordenadas principales a partir de las distancias genéticas de Nei (1987), con el fin de ilustrar los ejes principales de la variabilidad entre las líneas evaluadas, lo cual se plasmó en una gráfica de ordenación espacial (Fig. 3-2). De acuerdo con los resultados del análisis, los tres primeros componentes explicaron el 26,27% de la variabilidad genética entre las subpoblaciones, con porcentajes del 18.56%, 6.06% y 1.64%, respectivamente. A partir de esta información, se estableció la separación entre las subpoblaciones, observando dos grupos claramente diferenciados. Se asignaron colores de acuerdo con el color de grano para observar la distribución en la representación gráfica (Fig. 3-2). Adicionalmente, se plasmaron los mismos componentes principales, asignando colores de acuerdo con el origen de las líneas, con el fin de observar si la distribución puede estar relacionada (Fig. 3.3).

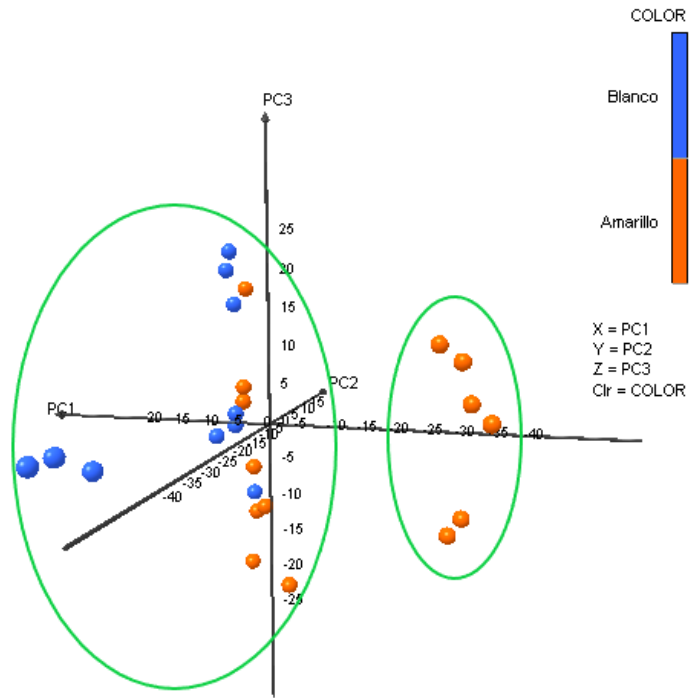


Figura 3-2 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al color de grano de los genotipos de acuerdo con la caracterización fenotípica

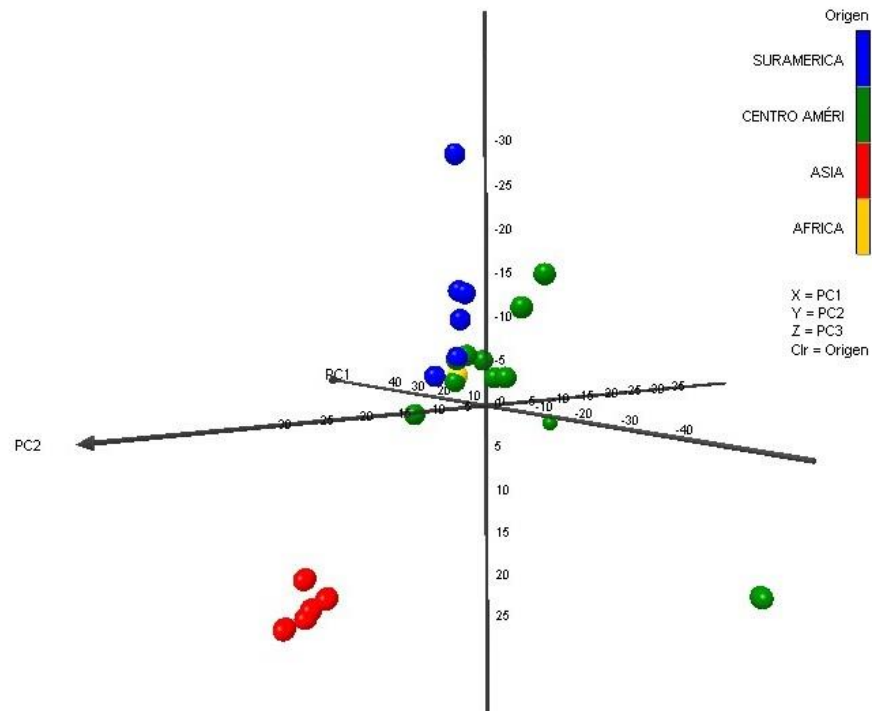


Figura 3-3 Representación gráfica en tres dimensiones de la ubicación espacial de las líneas evaluadas a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA). Los colores corresponden al origen de grano de los genotipos de acuerdo con la información del banco de germoplasma de Semillas Valle S.A.

En el análisis de estructura poblacional realizado en el software STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), se seleccionó el valor K óptimo a partir de la metodología propuesta por Evanno et al. (2005), mediante el gráfico del número de clústeres (K) con el delta K (ΔK), donde se evidenció un pico agudo en $K=2$ (Fig. 3-3), presentando un valor de ΔK de 9351.36. El valor K óptimo indica que las dos subpoblaciones tienen alta probabilidad para el agrupamiento de la población, sin embargo, el análisis de varianza para las variables fenotípicas no presenta diferencias estadísticas significativas entre las dos subpoblaciones definidas (Tabla 3-1). Las dos subpoblaciones fueron compuestas por 24 y 6 genotipos, respectivamente (Fig. 3-4 y Tabla 3-2). La clasificación de los genotipos corresponde con lo observado en el análisis de componentes principales. Por otra parte, el análisis de STRUCTURE permite estimar el índice de fijación (F_{ST}) para las dos subpoblaciones, estimando un valor de F_{ST} de 0.0102 para la población 1 y 0.4684 para la población 2, mientras que el valor de alfa promedio fue 0.0562 (Tabla 3-3). La divergencia de la frecuencia alélica entre las dos poblaciones fue de 0.0838 (Tabla 3-4), indicando divergencia entre ellas.

Tabla 3-1 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas DLP50, DEV50, Alpla, Almaz, AnchoHoja, LongEspiga y Diamtuza

	Df	DLP50	DEV50	Alpla	Almaz	AnchoHoja	LongEspiga	Diamtuza
Población	1	0.07ns	0.83ns	32.03ns	104.53ns	1.30ns	45.63ns	1.95ns
Residual	80	4.6354	4.3274	342.64	265.76	0.88356	45.113	1.2565

** Diferencias estadísticas significativas, $P < 0.01$. *** Diferencias estadísticas altamente significativas, $P < 0.001$. ns Diferencias estadísticas no significativas. DLP50 = días a liberación de polen al 50%; DEV50 = días a estigmas visibles al 50%; Alpla= altura de planta; Almaz= altura de mazorca; AnchoHoja = ancho de la lámina foliar en cm; LongEspiga = longitud de la espiga en cm; Diamtuza = diámetro de tuza en mm.

Tabla 3-2 Análisis de varianza para las características fenotípicas evaluadas Diammaz, Longmaz, No. Hileras, Granos/hilera, Tipogr, Color gr y Peso100sem

	Df	Diammaz	Longmaz	No.Hileras	Granos/hilera	Tipogr	Colorgr	Peso100sem
Población	1	4.56ns	59.50ns	34.13ns	130.21ns	1.41 ns	0.008 ns	295.47ns
Residual	80	3.6157	56.991	50.381	250.07	1.5461	1.51042	211.51

** Diferencias estadísticas significativas, $P < 0.01$. *** Diferencias estadísticas altamente significativas, $P < 0.001$. ns Diferencias estadísticas no significativas. Diammaz = diámetro de mazorca en mm; Longmaz = longitud de mazorca en mm; No. Hileras = número de hileras por mazorca, Granos/hilera = número de granos por hilera; Tipogr = tipo o textura de grano; Colorgr = color de grano; Peso100sem = índice de semilla calculado como peso de 100 semillas.

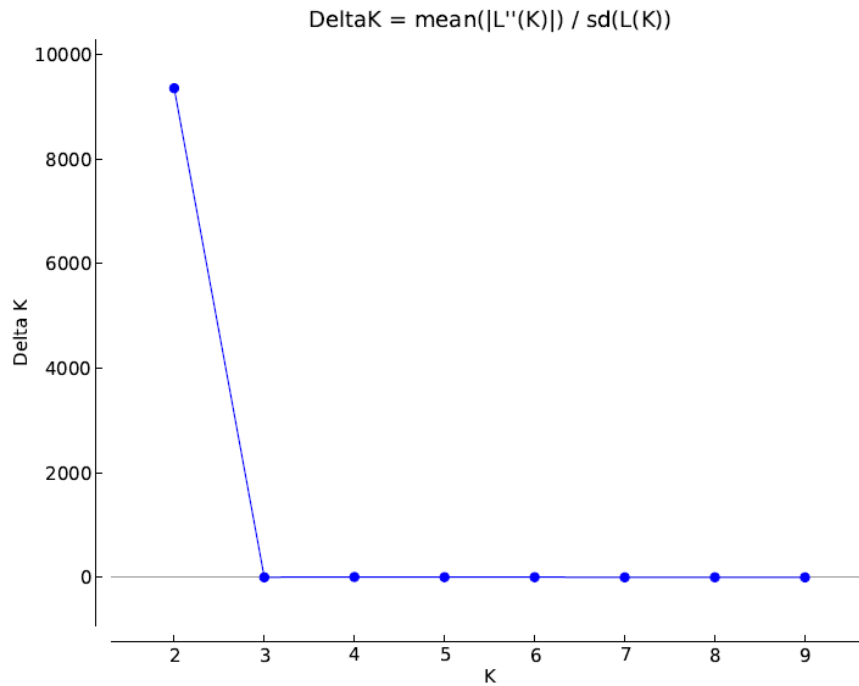


Figura 3-3 Delta K (Δ) para diferente número de subpoblaciones (K).

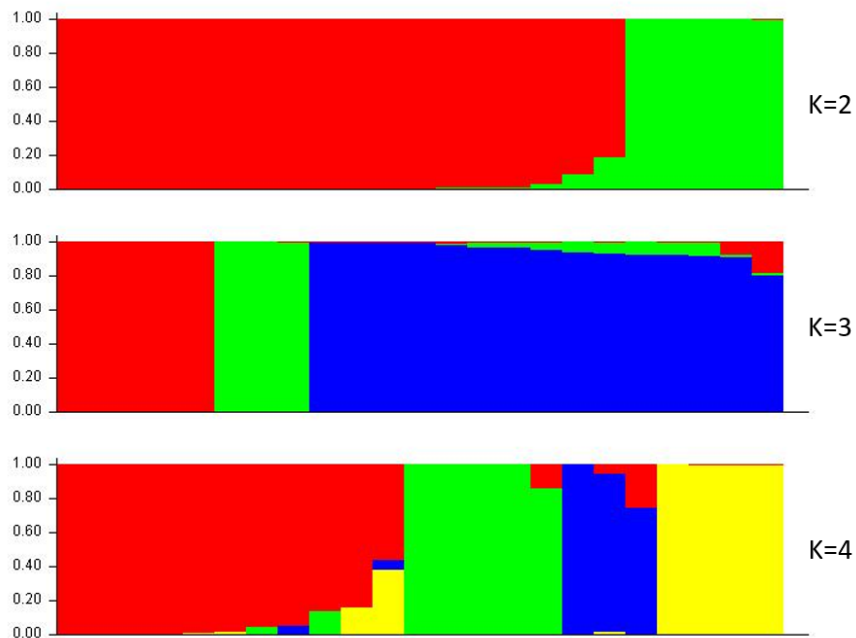


Figura 3-4 Estructura poblacional estimada de 30 líneas endocriadas de maíz tropical del programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. Diferentes colores indican la agrupación en una subpoblación diferente.

Tabla 3-3 Resultados de STRUCTURE para la proporción de genotipos inferidos en cada clúster, Heterocigosidad esperada (He) y número de genotipos asignados para cada población.

Población	Proporción de genotipos	He	No. De genotipos
Pob 1	0.768	0.3803	24
Pob 2	0.232	0.2497	6

Tabla 3-4 Valores promedio de Fst1, Fst2 y alfa inferidos de la aproximación basada en el modelo.

Valor promedio de Fst_1	0.0102
Valor promedio de Fst_2	0.4684
Valor promedio de alfa	0.0562

Tabla 3-5 Divergencia de frecuencia alélica entre las poblaciones inferidas de las líneas endocriadas de maíz.

Población	Pob 1	Pob 2
Pob 1	-	0.0838
Pob 2	0.0838	-

Considerando las dos subpoblaciones definidas a partir del análisis de estructura poblacional, se consideró cada una de ellas como un grupo heterótico debido a su divergencia genética. En la tabla 3-6 se indican los genotipos asignados a cada grupo.

Tabla 3-6 Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir del análisis de estructura poblacional

Grupo 1				Grupo 2
LA15	LA10	LB04	LA41	LA02
LA14	LB13	LB12	LB37	LA03
LB03	LA09	LB07	LB22	LA04
LB06	LA13	LB05	LB32	LA08

LB10	LA01	LA06	LB33	LA07
LB11	LA05	LB15	LB38	LA44

3.4.3 Comparación de los grupos heteróticos establecidos mediante las dos metodologías evaluadas.

En la tabla 3-7 se presentan los genotipos clasificados en cada uno de los grupos heteróticos mediante la metodología de dialelo y marcadores moleculares (SNPs), respectivamente. A partir de la metodología de dialelo se obtuvieron tres grupos heteróticos, compuestos por 7, 14 y 9 genotipos, respectivamente. Por otra parte, a partir del análisis de estructura poblacional con los SNPs se obtuvieron dos grupos heteróticos con 24 y 6 genotipos, respectivamente. Las líneas clasificadas en los grupos 2 y 3 del dialelo, corresponden en su mayoría a las líneas clasificadas en el grupo 1 del ensayo de SNPs. Por otra parte, el grupo 1 de dialelo, presenta cuatro líneas en común con el grupo 2 de SNPs. Sólo cinco de las 30 líneas evaluadas presentan una clasificación contrastante en las dos metodologías evaluadas: LA05, LB38, LB13, LA07 y LA44.

Tabla 3-7 Clasificación de grupos heteróticos para 30 líneas de maíz de origen tropical a partir de la habilidad combinatoria de sus cruzamientos y el análisis de estructura poblacional a partir de SNPs

LÍNEA	Dialelo			SNP	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2
LA02	X				X
LA03	X				X
LA04	X				X
LA05	X			X	
LA08	X				X
LB38	X			X	
LB13	X			X	
LA06		X		X	
LA09		X		X	
LA10		X		X	
LA13		X		X	
LA15		X		X	

<i>LB37</i>		X		X	
<i>LB33</i>		X		X	
<i>LB03</i>		X		X	
<i>LB04</i>		X		X	
<i>LB05</i>		X		X	
<i>LB06</i>		X		X	
<i>LB10</i>		X		X	
<i>LB12</i>		X		X	
<i>LB22</i>		X		X	
<i>LA01</i>			X	X	
<i>LA07</i>			X		X
<i>LA41</i>			X	X	
<i>LA44</i>			X		X
<i>LA14</i>			X	X	
<i>LB07</i>			X	X	
<i>LB11</i>			X	X	
<i>LB15</i>			X	X	
<i>LB32</i>			X	X	

Por otra parte, se realizó un cuadro comparativo de los costos para cada una de las metodologías, el cual se presenta en la tabla 3-8. El valor de costo por surco que se presenta en la tabla está definido con base en la información financiera de Semillas Valle S.A. donde se consideran todos los costos asociados a la producción de un surco dependiendo de la longitud de este. El número de surcos de línea corresponde al número de surcos requeridos de acuerdo con la producción promedio por surco de línea parental definido en 180 gramos de semilla por surco, lo cual se determinó con base en los promedios de producción históricos del programa de mejoramiento. Adicionalmente, para el ensayo con base en SNPs, se consideran 3 surcos por genotipo, dado que se requieren al menos 2 surcos para fenotipificación y 1 surco para producción de semilla para la secuenciación. Por último, se estableció un esquema que permitiera visualizar el tiempo requerido para el desarrollo de las metodologías evaluadas dado en semestres (Tabla 3-9).

Tabla 3-8 Costos para el desarrollo de un ensayo tipo dialelo y genotipificación por SNPs para 30 líneas de maíz de origen tropical

ITEM	Valor Unitario	Ensayo dialelo		Ensayo SNPs	
		Cantidad	Valor Total	Cantidad	Valor Total
Producción de semilla parental	\$ 28,070.38	60	\$ 1,684,222.80	90	\$ 2,526,334.20
Formación de híbridos	\$ 28,070.38	1305	\$ 36,631,845.90	-	-
Evaluación de híbridos	\$ 17,943.84	3694	\$ 66,284,544.96	-	-
Extracción de ADN	\$ 12,441.13	-	-	30	\$ 373,233.90
Secuenciación	\$ 318,492.80	-	-	30	\$ 9,554,784.00
TOTAL			\$ 104,600,613.66		\$ 12,454,352.10

Tabla 3-9 Esquema de tiempo para el desarrollo de un ensayo tipo dialelo y genotipificación por SNPs para 30 líneas de maíz de origen tropical

	Semestre 1		Semestre 2		Semestre 3		Semestre 4		Semestre 5	
Actividad	Ensayos de dialelo multilocalidad									
Aumentos de semilla por Línea Endogámica	X	X								
Formación de híbridos			X	X						
Registro de datos agronómicos					X	X	X	X		
Bases de datos Consolidadas							X		X	
Análisis Estadístico									X	
Clasificación de grupos heteróticos									X	
Resultados										X
	Ensayos genómicos									

Aumentos de semilla por Línea Endogámica	X	X								
Recolección de datos de pedigrí SV	X	X								
Secuenciación de líneas endocriadas			X							
Revisión de datos genéticos en bases de datos				X						
Análisis de datos de estructura genética				X						
Clasificación de grupos heteróticos				X						
Resultados					X					

3.5 Discusión

La determinación de grupos heteróticos es un aspecto crucial en el desarrollo de híbridos de maíz (Barata & Carena, 2006). Por tanto, los investigadores usan diversas metodologías que permitan realizar la clasificación de líneas endocriadas de forma eficiente. Dentro de las metodologías disponibles, los diseños de apareamiento como los ensayos de línea x probador, diseños de Carolina del Norte y los ensayos de tipo dialelo son ampliamente usados en el mejoramiento genético, (Olutayo Akinwale, 2021).

En el presente estudio se realizó un ensayo de tipo dialelo donde se involucraron 30 líneas de maíz élite del programa de mejoramiento genético de Semillas Valle S.A., similar a lo realizado por Bidhendi et al. (2009), quienes realizaron un ensayo de dialelo con 14 líneas parentales, evaluadas durante dos años en cuatro localidades, con el fin de determinar el patrón heterótico entre el germoplasma evaluado usando el análisis del método de Griffing. De acuerdo con la asunción de que la HCE de dos líneas de grupos heteróticos diferentes es mayor que la HCE de líneas del mismo grupo, las 14 líneas,

originarias de Estados Unidos, Irán y Centroamérica, fueron clasificadas en dos grupos heteróticos, confirmando el patrón heterótico esperado dentro de las líneas estadounidenses y encontrando también una alta habilidad combinatoria específica entre líneas de origen estadounidense y centroamericano (Bidhendi et al., 2009). Los resultados del presente estudio evidenciaron que la clasificación de los grupos heteróticos a partir del dialelo, con base en la habilidad combinatoria general de múltiples rasgos, permitió identificar 3 grupos, el primero con líneas de origen predominantemente de Asia, y el segundo y tercero con genotipos de origen centro y suramericano. Lo cual coincide con lo reportado por (Adu et al., 2022), quienes reportaron la eficiencia de la metodología, al clasificar 30 líneas de maíz de maduración temprana de dos colores de endospermo (15 blancas y 15 amarillas) y fuentes de germoplasma diversas, en 3 grupos heteróticos.

Por otra parte, la evaluación de la estructura poblacional y la diversidad genética a partir de SNPs con el fin de determinar grupos heteróticos ha sido empleada por diversos autores, demostrando su utilidad para este fin. Van Inghelandt et al. (2010), realizaron un estudio con 1537 líneas endocriadas élite de maíz genotipificadas con 359 SSR y 8244 SNP, a partir de los cuales se determinaron cuatro grupos heteróticos en el análisis realizado con el software STRUCTURE. En otro estudio, Zhang et al. (2016), evaluaron la diversidad genética y la estructura poblacional en 362 líneas endocriadas de maíz, importantes para el mejoramiento del sur de China, a partir de SNPs, identificando hasta seis subgrupos con genotipos de diferentes orígenes, encontrando mayor diversidad en el grupo correspondiente a genotipos tropicales respecto a los maíces templados. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los reportes en cuanto a la utilidad del método en la determinación de grupos heteróticos, sin embargo, la cantidad de grupos obtenida fue inferior con sólo dos subpoblaciones, lo cual puede estar relacionado con la cantidad de genotipos, y la ancestría de las líneas, ya que sólo se evaluaron 30 genotipos, mientras que en la mayoría de los reportes en literatura este número es superior (Adu et al., 2019; Richard et al., 2016; van Inghelandt et al., 2010; Zhang et al., 2016). Sin embargo, los grupos obtenidos corresponden con el origen de los materiales, ya que en el grupo 1 se clasificaron genotipos de centro y sur américa, mientras que en el segundo grupo se clasificaron genotipos de origen asiático. Estos resultados podrían indicar la presencia de diversidad genética limitada en la población

evaluada, ya que la identificación de subgrupos es un indicador de la abundancia de variabilidad genética existente en el germoplasma (Santos De Oliveira et al., 2021).

Aunque, en general, se prefiere tener un gran número de muestras (Nazareno et al., 2017), se ha demostrado que la evaluación de un número pequeño de muestras o individuos es suficiente para observar las divergencias entre subpoblaciones cuando se usan miles de SNPs bialélicos, tal como lo indica Li et al. (2020), quienes observaron que con una muestra de sólo seis individuos era posible estimar la diversidad genética entre poblaciones de *Harmonia axyridis*, usando marcadores de tipo SNP. Shi et al. (2010), establecieron que incluso con muestras pequeñas de la población es posible estimar la diversidad de esta, al demostrar que los resultados obtenidos a partir de submuestras de una población más grande fueron similares a los parámetros poblacionales obtenidos inicialmente. Los SNPs, dada su naturaleza binaria, tienen menor variabilidad que los loci con múltiples alelos, por lo cual se requieren muestras más pequeñas para obtener estimaciones acertadas de frecuencias alélicas e identificar patrones de variabilidad en una población (Porrás-Hurtado et al., 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos, las dos metodologías evaluadas permiten clasificar los 30 genotipos en dos grupos genéticamente contrastantes o grupos heteróticos. La clasificación de las líneas endocriadas de maíz está influenciada por la metodología utilizada por los investigadores (Fan et al., 2009). Por tanto, algunos autores han realizado análisis comparativos entre la clasificación de grupos heteróticos a partir de datos fenotípicos y de marcadores moleculares con el fin de establecer la eficiencia de ambas aproximaciones (Aguiar et al., 2008; Badu-Apraku et al., 2015; Barata & Carena, 2006; Santos De Oliveira et al., 2021; K. J. Silva et al., 2020).

Barata & Carena (2006) clasificaron 13 líneas endocriadas North Dakota élite en grupos heteróticos con el fin de establecer la consistencia entre los resultados obtenidos mediante el agrupamiento usando secuencias repetitivas simples (SSR) y datos fenotípicos obtenidos en un ensayo de tipo dialelo. También, Aguiar et al. (2008), clasificaron 16 líneas de maíz de origen tropical mediante la evaluación de cruzamientos de prueba con líneas de grupo heterótico conocido, y SSRs con el fin de comparar la precisión de los métodos de agrupamiento para la formación de grupos heterogéneos en maíz. Los resultados de estos ensayos indican que los marcadores moleculares SSR

permiten la clasificación de líneas endocriadas en grupos heteróticos, obteniendo resultados similares a los agrupamientos con base en datos fenotípicos, sin embargo, se presentan algunas inconsistencias y por tanto los datos de ensayos de campo en diferentes ambientes continúan siendo esenciales para clasificar líneas no relacionadas en grupos heteróticos (Aguiar et al., 2008; Barata & Carena, 2006).

Badu-Apraku et al. (2015), compararon la eficiencia de la clasificación de 14 líneas de maíz mediante la evaluación de SNPs y la HCG y HCE en ensayos de campo, encontrando que se tiene una correspondencia cercana entre las clasificaciones de las metodologías evaluadas en términos de la asignación de líneas en los grupos heteróticos. Similar a lo reportado por Santos De Oliveira et al. (2021), quienes clasificaron 293 líneas endocriadas de grupo heterótico conocido, mediante 5252 SNPs, encontrando que se presenta consistencia entre el agrupamiento basado en las distancias genéticas y los grupos previamente establecidos para las líneas en estudio, con 3.4% de líneas con una clasificación diferente a la esperada. Los hallazgos del presente estudio no están muy corresponden a un 16.6% de divergencia entre la clasificación por ambas metodologías.

Los agrupamientos de líneas de maíz usando marcadores moleculares de alta densidad como los SNP, es una metodología de alta precisión que permite realizar una clasificación adecuada de las líneas sin llevar a cabo experimentos para obtener habilidad combinatoria en campo (Santos De Oliveira et al., 2021). Los resultados del presente estudio soportan hallazgos previos respecto a la utilidad de los estudios de diversidad genética a partir de marcadores moleculares SNPs en la clasificación de líneas de maíz en grupos genéticos, permitiendo la selección de parentales para la formación de híbridos con características genéticas contrastantes, evitando la formación de híbridos entre líneas genéticamente similares o dentro de los grupos heteróticos (Santos De Oliveira et al., 2021; Silva et al., 2020). Sin embargo, algunos autores indican que las distancias genéticas entre las líneas definidas a partir de SNPs no son buenos predictores de comportamiento *per se* de los híbridos en rendimiento (Silva et al., 2020), Otra limitación puede ser el requerimiento de un alto número de marcadores para obtener una clasificación adecuada (Barata & Carena, 2006).

Por otra parte, el comparativo de costos entre el desarrollo del ensayo de dialelo y el ensayo con SNPs indica que la implementación del dialelo es 8,3 veces más costoso respecto a la genotipificación con el Maize50KSNP BeadChip (Tabla 3-6) y el tiempo requerido es 3 veces más largo, debido al requerimiento de producción de semilla y varias observaciones de híbridos en campo (Tabla 3-9). Esta observación está en concordancia con lo reportado por Fan et al., (2009) y Goyal (2021), indicando que los métodos moleculares para clasificar líneas endocriadas en grupos heteróticos usualmente son más rápidos y pueden ser más económicos, ya que no requieren la evaluación de gran cantidad de materiales en campo. En estados avanzados de mejoramiento, los métodos basados en datos genéticos y marcadores moleculares son ampliamente utilizados ya que tienen un alto nivel de precisión, dado que sus resultados están mínimamente influenciados por el ambiente (Aguiar et al., 2008; Olutayo Akinwale, 2021). Silva et al., (2020), indican que la metodología de SNPs puede proveer información importante para la selección de parentales y servir como base para el planteamiento de esquemas de cruzamiento adecuados. Debido a que los resultados entre los agrupamientos con marcadores y con los datos de campo presentan algunas inconsistencias, algunos autores concluyen que los datos de ensayos de campo en diferentes ambientes continúan siendo esenciales para clasificar líneas no relacionadas en grupos heteróticos (Aguiar et al., 2008; Barata & Carena, 2006)

Sin embargo, usualmente la clasificación de líneas nuevas en grupos heteróticos se realiza a partir de diseños de esquemas de cruzamientos con un probador de grupo heterótico conocido (Olutayo Akinwale, 2021), tal como Chandel et al., (2019), quienes clasificaron 11 líneas nuevas usando un diseño de cruzamientos línea x probador, con 2 probadores diversos. Fan et al., (2009), también realizaron un ensayo con 23 líneas endocriadas, que fueron clasificadas en cuatro grupos heteróticos a partir de un diseño de cruzamientos con 4 probadores de grupo heterótico conocido, demostrando la utilidad de los cruzamientos de línea x probador en la clasificación de líneas. Menkir et al., (2004) recomiendan la combinación de ensayos con probadores heteróticos y marcadores moleculares como la mejor alternativa para clasificar líneas endocriadas de maíz tropical. Usualmente, cuando no se cuenta con probadores heteróticos definidos se recurre a la implementación de diseños de apareamiento como el método de dialelo o los Diseños de Carolina del Norte son usados tanto para determinar grupos heteróticos como para la identificación de probadores heteróticos (Olutayo Akinwale, 2021).

3.6 Conclusiones

Tanto la metodología del dialelo como los marcadores moleculares tipo SNP fueron eficientes en la clasificación de líneas endocriadas en grupos genéticos contrastantes, obteniendo dos grupos heteróticos para el carácter rendimiento de grano, con una divergencia en la clasificación del 16.6%.

El uso de marcadores moleculares resulta ser una metodología más fácil de implementar, con un costo más bajo y menor tiempo requerido para su implementación, por lo cual permite la inclusión de mayor cantidad de líneas en un mismo ensayo.

Aunque el ensayo dialelo, es útil para clasificar las líneas en grupos heteróticos, es una metodología restrictiva ya que requiere una alta inversión de recursos para la producción de semilla y posterior evaluación de híbridos en campo. Sin embargo, su aplicación contribuye en la selección de parentales probadores representativos para cada grupo heterótico identificado, que permitan realizar una clasificación de líneas nuevas mediante cruzamientos de línea x probador.

La separación de las líneas endocriadas en grupos heteróticos constituye la base para el direccionamiento en la formación de híbridos nuevos en el programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A., contribuyendo a mejorar la eficiencia debido a la posibilidad de evitar la formación de híbridos entre líneas genéticamente similares, que no expresarán en campo la heterosis requerida en el mejoramiento de híbridos de maíz.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

1. El ensayo de dialelo permitió evaluar la diversidad genética presente en el germoplasma a partir de la caracterización de los híbridos evaluados, y la relación entre los caracteres fenotípicos y el rendimiento de grano. Adicionalmente, fue posible realizar el agrupamiento de las líneas parentales en tres grupos heteróticos lo cual fue posible relacionar con el origen del germoplasma. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de esta metodología para los programas de mejoramiento genético.
2. La metodología de marcadores moleculares SNP permitió establecer la presencia de diversidad genética notable en el germoplasma evaluado. A partir de este análisis fue posible clasificar las líneas parentales en tres grupos genéticamente contrastantes, asociados al origen del germoplasma. La mayor distancia genética se encontró entre los grupos 2 y 3, indicando que la heterosis de híbridos formados con líneas parentales de estos dos grupos podría ser mayor.
3. Aunque las dos metodologías evaluadas permiten la identificación de grupos heteróticos, el costo asociado a la implementación de cada una de ellas, constituye un factor importante para los programas de mejoramiento genético, ya que los recursos pueden ser limitados y se deben enfocar los esfuerzos en el uso eficiente de los mismos. El presente estudio permitió identificar que los marcadores moleculares son la opción con un costo más bajo y menor tiempo requerido para su implementación.

4.2 Recomendaciones

1. Ya que la clasificación de las líneas endocriadas en grupos heteróticos es la base para el desarrollo del mejoramiento genético de híbridos, se considera que este estudio exploratorio del germoplasma debe constituir la base para la implementación de nuevas metodologías de clasificación de líneas en el programa de mejoramiento de Semillas Valle S.A. a partir de ensayos de cruzamiento líneas x probador.
2. La clasificación de las líneas endocriadas obtenida en este estudio debe ser confirmada mediante el análisis del comportamiento de los híbridos formados con las mismas, con el fin de establecer la heterosis en híbridos de poblaciones contrastantes y con mayor divergencia genética, acuerdo a los esperado.
3. En caso de que se cuente con los recursos suficientes, implementar las dos metodologías hará posible la obtención de información complementaria que contribuya al análisis detallado del germoplasma y facilite la explotación de los recursos genéticos con que se cuenta.

Anexos

A. Anexo 1: Estimación de Habilidad Combinatoria Específica en el rasgo de rendimiento para 435 híbridos y 30 líneas endogámicas de Maíz tropical.

Hembra	Macho	HCE	Error	T_Value	Prob_T	Significancia	Hembra	Macho	HCE	Error	T_Value	Prob_T	Significancia
LB04	LA02	2.0759	0.5787	3.5875	0.0004	***	LB10	LB06	0.3287	0.5787	0.5680	0.5703	ns
LB22	LA03	1.9566	0.5787	3.3814	0.0008	***	LA44	LA07	0.3276	0.5787	0.5662	0.5716	ns
LA14	LA06	1.9063	0.5787	3.2944	0.0011	**	LB06	LA14	0.3258	0.5787	0.5630	0.5737	ns
LB15	LA08	1.8803	0.5787	3.2494	0.0012	**	LB33	LA15	0.3226	0.5787	0.5576	0.5774	ns
LB12	LB11	1.8180	0.5787	3.1417	0.0018	**	LB11	LA41	0.3218	0.5787	0.5562	0.5784	ns
LB06	LA03	1.7864	0.5787	3.0872	0.0021	**	LA15	LA02	0.3181	0.5787	0.5497	0.5828	ns
LB15	LA04	1.7786	0.5787	3.0736	0.0022	**	LB12	LB33	0.3180	0.5787	0.5495	0.5830	ns
LB37	LA08	1.7682	0.5787	3.0557	0.0024	**	LB05	LA13	0.3128	0.5787	0.5405	0.5891	ns
LB03	LA07	1.7569	0.5787	3.0362	0.0025	**	LA06	LA05	0.3123	0.5787	0.5397	0.5897	ns
LA41	LA08	1.6926	0.5787	2.9251	0.0036	**	LB13	LA14	0.3105	0.5787	0.5365	0.5919	ns
LA10	LA03	1.6320	0.5787	2.8204	0.0050	**	LB12	LA44	0.3090	0.5787	0.5339	0.5937	ns
LB15	LA09	1.6185	0.5787	2.7971	0.0054	**	LB11	LA13	0.3045	0.5787	0.5262	0.5990	ns
LB32	LA15	1.6080	0.5787	2.7789	0.0057	**	LA13	LA10	0.3024	0.5787	0.5226	0.6015	ns
LB03	LA14	1.5796	0.5787	2.7297	0.0066	**	LB37	LA41	0.3010	0.5787	0.5202	0.6032	ns
LA08	LA07	1.5368	0.5787	2.6558	0.0082	**	LB37	LA14	0.2935	0.5787	0.5071	0.6123	ns

LB33	LA02	1.5275	0.5787	2.6398	0.0086	**	LB11	LA01	0.2917	0.5787	0.5041	0.6144	ns
LB10	LB37	1.5228	0.5787	2.6317	0.0088	**	LB15	LB22	0.2910	0.5787	0.5029	0.6153	ns
LB10	LB32	1.4933	0.5787	2.5806	0.0102	**	LB38	LA09	0.2851	0.5787	0.4927	0.6225	ns
LB12	LA03	1.4796	0.5787	2.5570	0.0109	**	LA44	LA09	0.2756	0.5787	0.4763	0.6341	ns
LB32	LA08	1.4750	0.5787	2.5491	0.0111	**	LB37	LA06	0.2724	0.5787	0.4708	0.6380	ns
LB04	LA03	1.4417	0.5787	2.4914	0.0131	**	LA41	LA01	0.2685	0.5787	0.4640	0.6429	ns
LA05	LA02	1.4269	0.5787	2.4659	0.0141	**	LB15	LB07	0.2654	0.5787	0.4587	0.6467	ns
LB06	LA02	1.4233	0.5787	2.4597	0.0143	**	LA13	LA06	0.2641	0.5787	0.4564	0.6483	ns
LA13	LA08	1.3978	0.5787	2.4157	0.0161	**	LB32	LA41	0.2611	0.5787	0.4513	0.6520	ns
LA14	LA07	1.3956	0.5787	2.4119	0.0163	**	LB11	LA10	0.2451	0.5787	0.4236	0.6721	ns
LA14	LA03	1.3778	0.5787	2.3810	0.0177	**	LB12	LA10	0.2408	0.5787	0.4162	0.6775	ns
LB33	LB03	1.3617	0.5787	2.3532	0.0191	**	LB38	LB10	0.2370	0.5787	0.4096	0.6823	ns
LA15	LA03	1.3595	0.5787	2.3494	0.0192	**	LB10	LA08	0.2331	0.5787	0.4028	0.6873	ns
LA14	LA13	1.3523	0.5787	2.3369	0.0199	**	LA09	LA03	0.2296	0.5787	0.3968	0.6917	ns
LB15	LA01	1.3435	0.5787	2.3218	0.0207	**	LA10	LA09	0.2292	0.5787	0.3961	0.6922	ns
LA15	LA08	1.3397	0.5787	2.3152	0.0211	**	LB12	LA06	0.2292	0.5787	0.3960	0.6923	ns
LB11	LA05	1.3297	0.5787	2.2980	0.0220	**	LB13	LB04	0.2265	0.5787	0.3914	0.6957	ns
LB12	LA13	1.3230	0.5787	2.2863	0.0227	**	LB04	LA13	0.2261	0.5787	0.3907	0.6962	ns
LA13	LA09	1.3154	0.5787	2.2732	0.0235	**	LA07	LA06	0.2237	0.5787	0.3866	0.6992	ns
LA10	LA07	1.3017	0.5787	2.2495	0.0250	**	LB33	LB32	0.2207	0.5787	0.3815	0.7030	ns
LB15	LA07	1.3012	0.5787	2.2487	0.0250	**	LB12	LB06	0.2184	0.5787	0.3774	0.7060	ns
LA14	LA02	1.2871	0.5787	2.2242	0.0266	**	LB32	LB05	0.2053	0.5787	0.3549	0.7229	ns
LB12	LA08	1.2865	0.5787	2.2233	0.0267	**	LB22	LA09	0.1972	0.5787	0.3408	0.7334	ns
LA41	LA03	1.2823	0.5787	2.2160	0.0272	**	LB11	LB03	0.1944	0.5787	0.3360	0.7370	ns
LB13	LB07	1.2810	0.5787	2.2137	0.0274	**	LB11	LB32	0.1886	0.5787	0.3260	0.7446	ns
LB05	LB37	1.2754	0.5787	2.2041	0.0280	**	LB10	LA02	0.1879	0.5787	0.3246	0.7456	ns
LA13	LA44	1.2714	0.5787	2.1971	0.0285	**	LA44	LA05	0.1866	0.5787	0.3225	0.7473	ns
LA15	LA10	1.2710	0.5787	2.1965	0.0286	**	LB22	LA07	0.1843	0.5787	0.3184	0.7503	ns
LA09	LA04	1.2388	0.5787	2.1408	0.0328	**	LB06	LA05	0.1823	0.5787	0.3151	0.7529	ns
LB33	LA04	1.2387	0.5787	2.1407	0.0329	**	LB38	LB06	0.1808	0.5787	0.3124	0.7549	ns
LB33	LA07	1.2338	0.5787	2.1322	0.0336	**	LB07	LA07	0.1703	0.5787	0.2943	0.7687	ns
LB11	LB05	1.2332	0.5787	2.1312	0.0336	**	LA14	LA41	0.1702	0.5787	0.2942	0.7688	ns
LA15	LA44	1.2330	0.5787	2.1308	0.0337	**	LB13	LA03	0.1663	0.5787	0.2874	0.7739	ns
LB33	LA44	1.2270	0.5787	2.1204	0.0345	**	LB32	LA10	0.1587	0.5787	0.2743	0.7840	ns
LB05	LA02	1.2250	0.5787	2.1170	0.0348	**	LB05	LA44	0.1513	0.5787	0.2615	0.7938	ns
LA15	LA04	1.2179	0.5787	2.1047	0.0359	**	LB03	LA05	0.1440	0.5787	0.2489	0.8036	ns
LB22	LA04	1.2133	0.5787	2.0968	0.0366	**	LB07	LB37	0.1416	0.5787	0.2447	0.8068	ns
LB05	LA06	1.1956	0.5787	2.0662	0.0394	**	LB05	LA09	0.1387	0.5787	0.2397	0.8107	ns
LB22	LA05	1.1869	0.5787	2.0512	0.0408	**	LB38	LA14	0.1342	0.5787	0.2319	0.8167	ns
LA09	LA07	1.1865	0.5787	2.0505	0.0409	**	LA41	LA05	0.1257	0.5787	0.2171	0.8282	ns
LB07	LA01	1.1686	0.5787	2.0194	0.0441	**	LB03	LA01	0.1180	0.5787	0.2040	0.8385	ns

LB32	LA09	1.1437	0.5787	1.9765	0.0487	**	LB03	LA13	0.1145	0.5787	0.1979	0.8432	ns
LA10	LA06	1.1431	0.5787	1.9754	0.0489	**	LB12	LB32	0.1136	0.5787	0.1964	0.8444	ns
LB06	LB37	1.1401	0.5787	1.9703	0.0494	**	LB22	LA06	0.1068	0.5787	0.1846	0.8536	ns
LB15	LA06	1.1268	0.5787	1.9473	0.0521	ns	LA13	LA02	0.1027	0.5787	0.1775	0.8592	ns
LB38	LA03	1.1260	0.5787	1.9458	0.0523	ns	LB13	LA44	0.0979	0.5787	0.1691	0.8658	ns
LB11	LB06	1.1255	0.5787	1.9450	0.0524	ns	LB15	LA44	0.0952	0.5787	0.1645	0.8694	ns
LB12	LB05	1.1227	0.5787	1.9401	0.0530	ns	LA02	LA01	0.0899	0.5787	0.1554	0.8766	ns
LB04	LA15	1.1144	0.5787	1.9259	0.0548	ns	LB33	LA08	0.0888	0.5787	0.1535	0.8781	ns
LB15	LB10	1.1117	0.5787	1.9211	0.0554	ns	LB05	LA41	0.0789	0.5787	0.1364	0.8916	ns
LB32	LA06	1.1026	0.5787	1.9054	0.0574	ns	LA13	LA07	0.0774	0.5787	0.1337	0.8937	ns
LA13	LA01	1.0958	0.5787	1.8937	0.0589	ns	LB13	LB37	0.0753	0.5787	0.1302	0.8965	ns
LB10	LB05	1.0855	0.5787	1.8758	0.0613	ns	LB10	LA15	0.0694	0.5787	0.1200	0.9046	ns
LB07	LB06	1.0798	0.5787	1.8660	0.0627	ns	LB05	LA08	0.0656	0.5787	0.1134	0.9098	ns
LB13	LA07	1.0751	0.5787	1.8580	0.0639	ns	LB13	LA06	0.0619	0.5787	0.1070	0.9148	ns
LB12	LB04	1.0706	0.5787	1.8502	0.0650	ns	LA05	LA01	0.0434	0.5787	0.0750	0.9402	ns
LB32	LB37	1.0660	0.5787	1.8422	0.0661	ns	LB32	LB04	0.0420	0.5787	0.0725	0.9422	ns
LB22	LA08	1.0633	0.5787	1.8375	0.0668	ns	LB11	LB10	0.0322	0.5787	0.0557	0.9556	ns
LA41	LA06	1.0631	0.5787	1.8371	0.0669	ns	LB04	LB37	0.0213	0.5787	0.0368	0.9707	ns
LB38	LA04	1.0494	0.5787	1.8136	0.0704	ns	LB10	LB04	0.0153	0.5787	0.0265	0.9789	ns
LB11	LA08	1.0346	0.5787	1.7879	0.0745	ns	LB37	LA07	0.0135	0.5787	0.0233	0.9814	ns
LB11	LA44	1.0321	0.5787	1.7836	0.0752	ns	LB22	LA41	0.0135	0.5787	0.0233	0.9814	ns
LB15	LB11	1.0163	0.5787	1.7563	0.0797	ns	LB03	LB37	0.0093	0.5787	0.0161	0.9871	ns
LB07	LA10	1.0148	0.5787	1.7538	0.0802	ns	LA07	LA05	0.0004	0.5787	0.0007	0.9995	ns
LB07	LA02	1.0143	0.5787	1.7528	0.0803	ns	LB38	LB32	-0.0128	0.5787	-0.0221	0.9824	ns
LB05	LA03	1.0085	0.5787	1.7428	0.0821	ns	LB10	LB22	-0.0129	0.5787	-0.0223	0.9822	ns
LB15	LB04	1.0076	0.5787	1.7413	0.0823	ns	LB03	LA15	-0.0143	0.5787	-0.0248	0.9803	ns
LB32	LB07	0.9858	0.5787	1.7036	0.0892	ns	LA09	LA05	-0.0274	0.5787	-0.0474	0.9622	ns
LB33	LA09	0.9805	0.5787	1.6945	0.0909	ns	LB13	LA10	-0.0300	0.5787	-0.0519	0.9587	ns
LB13	LB10	0.9793	0.5787	1.6924	0.0913	ns	LB10	LB33	-0.0338	0.5787	-0.0585	0.9534	ns
LB06	LA41	0.9767	0.5787	1.6878	0.0922	ns	LB13	LA41	-0.0365	0.5787	-0.0630	0.9498	ns
LA10	LA04	0.9761	0.5787	1.6868	0.0924	ns	LB07	LA15	-0.0392	0.5787	-0.0677	0.9461	ns
LB15	LB13	0.9653	0.5787	1.6681	0.0960	ns	LB03	LA06	-0.0411	0.5787	-0.0710	0.9434	ns
LB10	LB03	0.9426	0.5787	1.6289	0.1041	ns	LB38	LA10	-0.0413	0.5787	-0.0713	0.9432	ns
LB04	LA14	0.9402	0.5787	1.6248	0.1049	ns	LA44	LA03	-0.0539	0.5787	-0.0932	0.9258	ns
LB38	LA13	0.9325	0.5787	1.6115	0.1078	ns	LB12	LA14	-0.0585	0.5787	-0.1010	0.9196	ns
LB10	LA01	0.9249	0.5787	1.5983	0.1107	ns	LB12	LA41	-0.0597	0.5787	-0.1031	0.9179	ns
LB07	LA03	0.9237	0.5787	1.5962	0.1112	ns	LB22	LA13	-0.0613	0.5787	-0.1059	0.9157	ns
LB04	LA04	0.9232	0.5787	1.5954	0.1114	ns	LA10	LA02	-0.0626	0.5787	-0.1082	0.9139	ns
LB05	LA01	0.9148	0.5787	1.5810	0.1146	ns	LB11	LA03	-0.0637	0.5787	-0.1101	0.9124	ns
LB33	LA03	0.9113	0.5787	1.5749	0.1160	ns	LB04	LA01	-0.0722	0.5787	-0.1248	0.9008	ns
LB37	LA03	0.9097	0.5787	1.5722	0.1166	ns	LB11	LA04	-0.0741	0.5787	-0.1280	0.8982	ns

LB05	LA04	0.9053	0.5787	1.5644	0.1184	ns	LA15	LA41	-0.0765	0.5787	-0.1323	0.8948	ns
LB12	LA04	0.9041	0.5787	1.5625	0.1189	ns	LB37	LA44	-0.0828	0.5787	-0.1431	0.8862	ns
LB11	LA02	0.8999	0.5787	1.5551	0.1206	ns	LB32	LB22	-0.0850	0.5787	-0.1468	0.8833	ns
LB38	LB11	0.8891	0.5787	1.5366	0.1251	ns	LB12	LB10	-0.0865	0.5787	-0.1496	0.8812	ns
LB05	LA14	0.8859	0.5787	1.5309	0.1265	ns	LB22	LA10	-0.0937	0.5787	-0.1619	0.8715	ns
LB13	LB33	0.8800	0.5787	1.5208	0.1290	ns	LB10	LA10	-0.0976	0.5787	-0.1687	0.8661	ns
LB07	LB05	0.8783	0.5787	1.5179	0.1298	ns	LB38	LA02	-0.1005	0.5787	-0.1737	0.8621	ns
LB06	LB22	0.8781	0.5787	1.5175	0.1299	ns	LB33	LA06	-0.1183	0.5787	-0.2044	0.8381	ns
LB07	LA06	0.8647	0.5787	1.4943	0.1358	ns	LA04	LA01	-0.1264	0.5787	-0.2184	0.8272	ns
LB33	LB06	0.8628	0.5787	1.4911	0.1367	ns	LB13	LB06	-0.1270	0.5787	-0.2195	0.8263	ns
LA10	LA05	0.8624	0.5787	1.4903	0.1369	ns	LB11	LA14	-0.1449	0.5787	-0.2504	0.8024	ns
LB33	LB04	0.8615	0.5787	1.4889	0.1372	ns	LB15	LA15	-0.1592	0.5787	-0.2752	0.7833	ns
LB10	LA06	0.8581	0.5787	1.4830	0.1388	ns	LB33	LA41	-0.1618	0.5787	-0.2796	0.7799	ns
LA08	LA05	0.8570	0.5787	1.4810	0.1393	ns	LA13	LA41	-0.1658	0.5787	-0.2865	0.7747	ns
LB06	LA15	0.8500	0.5787	1.4689	0.1426	ns	LB37	LA10	-0.1669	0.5787	-0.2884	0.7731	ns
LB37	LA04	0.8491	0.5787	1.4673	0.1430	ns	LA15	LA13	-0.1859	0.5787	-0.3213	0.7481	ns
LB04	LB03	0.8430	0.5787	1.4568	0.1459	ns	LB13	LB12	-0.1896	0.5787	-0.3276	0.7434	ns
LB03	LA44	0.8398	0.5787	1.4513	0.1474	ns	LB11	LA15	-0.1989	0.5787	-0.3438	0.7312	ns
LB15	LB32	0.8329	0.5787	1.4393	0.1508	ns	LB33	LA01	-0.2057	0.5787	-0.3555	0.7224	ns
LB03	LA04	0.8288	0.5787	1.4323	0.1528	ns	LB15	LB38	-0.2104	0.5787	-0.3637	0.7163	ns
LB15	LB03	0.8254	0.5787	1.4265	0.1544	ns	LB38	LA15	-0.2130	0.5787	-0.3681	0.7130	ns
LA10	LA01	0.8124	0.5787	1.4040	0.1610	ns	LB32	LA07	-0.2160	0.5787	-0.3733	0.7091	ns
LB06	LA07	0.8112	0.5787	1.4019	0.1617	ns	LB10	LA14	-0.2181	0.5787	-0.3770	0.7064	ns
LA13	LA05	0.8062	0.5787	1.3933	0.1642	ns	LA05	LA04	-0.2330	0.5787	-0.4026	0.6874	ns
LB04	LA08	0.8023	0.5787	1.3866	0.1663	ns	LB11	LB33	-0.2390	0.5787	-0.4130	0.6798	ns
LB04	LA41	0.7965	0.5787	1.3765	0.1694	ns	LB06	LA09	-0.2459	0.5787	-0.4249	0.6711	ns
LA08	LA06	0.7934	0.5787	1.3712	0.1710	ns	LB38	LA06	-0.2480	0.5787	-0.4286	0.6684	ns
LB38	LB33	0.7909	0.5787	1.3668	0.1724	ns	LB10	LA41	-0.2491	0.5787	-0.4306	0.6670	ns
LA41	LA09	0.7742	0.5787	1.3380	0.1816	ns	LB11	LB22	-0.2660	0.5787	-0.4596	0.6460	ns
LA41	LA04	0.7721	0.5787	1.3343	0.1828	ns	LB38	LB04	-0.2910	0.5787	-0.5029	0.6153	ns
LA14	LA08	0.7711	0.5787	1.3327	0.1833	ns	LA44	LA10	-0.3086	0.5787	-0.5333	0.5941	ns
LB04	LB22	0.7706	0.5787	1.3318	0.1836	ns	LB06	LA13	-0.3094	0.5787	-0.5347	0.5931	ns
LB10	LA03	0.7698	0.5787	1.3303	0.1841	ns	LB13	LA09	-0.3184	0.5787	-0.5503	0.5824	ns
LB10	LA05	0.7644	0.5787	1.3211	0.1872	ns	LB12	LB37	-0.3194	0.5787	-0.5521	0.5812	ns
LA09	LA02	0.7635	0.5787	1.3194	0.1877	ns	LA05	LA03	-0.3257	0.5787	-0.5629	0.5738	ns
LA44	LA08	0.7613	0.5787	1.3157	0.1890	ns	LB11	LA07	-0.3483	0.5787	-0.6020	0.5475	ns
LB32	LA04	0.7553	0.5787	1.3053	0.1925	ns	LB22	LA44	-0.3491	0.5787	-0.6032	0.5467	ns
LB06	LA06	0.7472	0.5787	1.2913	0.1973	ns	LB33	LB05	-0.3539	0.5787	-0.6115	0.5412	ns
LB37	LA05	0.7453	0.5787	1.2881	0.1984	ns	LB12	LA05	-0.4082	0.5787	-0.7055	0.4809	ns
LB13	LB11	0.7418	0.5787	1.2820	0.2005	ns	LB32	LA03	-0.4109	0.5787	-0.7101	0.4780	ns
LB38	LA08	0.7240	0.5787	1.2512	0.2115	ns	LA15	LA06	-0.4190	0.5787	-0.7241	0.4694	ns

LB05	LA15	0.7232	0.5787	1.2498	0.2120	ns	LB13	LA05	-0.4286	0.5787	-0.7406	0.4593	ns
LB05	LA07	0.7120	0.5787	1.2305	0.2192	ns	LA15	LA01	-0.4540	0.5787	-0.7845	0.4331	ns
LB04	LA09	0.7113	0.5787	1.2292	0.2197	ns	LB07	LB03	-0.4547	0.5787	-0.7858	0.4324	ns
LB07	LA13	0.7097	0.5787	1.2265	0.2207	ns	LA15	LA07	-0.4563	0.5787	-0.7886	0.4308	ns
LB38	LB05	0.7076	0.5787	1.2228	0.2221	ns	LB10	LA13	-0.4605	0.5787	-0.7959	0.4266	ns
LA13	LA03	0.7057	0.5787	1.2196	0.2233	ns	LB04	LA05	-0.4777	0.5787	-0.8255	0.4095	ns
LB15	LA02	0.6967	0.5787	1.2040	0.2292	ns	LB13	LA08	-0.4813	0.5787	-0.8317	0.4060	ns
LB22	LA01	0.6922	0.5787	1.1962	0.2323	ns	LB32	LB06	-0.4959	0.5787	-0.8570	0.3919	ns
LB32	LA02	0.6907	0.5787	1.1937	0.2332	ns	LB06	LA10	-0.5020	0.5787	-0.8676	0.3861	ns
LB07	LA08	0.6869	0.5787	1.1870	0.2359	ns	LB38	LB12	-0.5081	0.5787	-0.8780	0.3804	ns
LB12	LA07	0.6769	0.5787	1.1698	0.2427	ns	LA06	LA01	-0.5129	0.5787	-0.8864	0.3759	ns
LB07	LB22	0.6742	0.5787	1.1651	0.2446	ns	LB15	LA05	-0.5210	0.5787	-0.9005	0.3684	ns
LB10	LA04	0.6738	0.5787	1.1644	0.2449	ns	LB38	LA01	-0.5352	0.5787	-0.9249	0.3555	ns
LB37	LA01	0.6728	0.5787	1.1628	0.2456	ns	LB11	LB37	-0.5637	0.5787	-0.9742	0.3305	ns
LB12	LB22	0.6610	0.5787	1.1423	0.2540	ns	LB15	LB12	-0.5727	0.5787	-0.9897	0.3229	ns
LA44	LA02	0.6595	0.5787	1.1398	0.2550	ns	LA06	LA02	-0.5988	0.5787	-1.0347	0.3014	ns
LA06	LA03	0.6496	0.5787	1.1226	0.2622	ns	LB32	LA14	-0.6092	0.5787	-1.0527	0.2930	ns
LB15	LA03	0.6420	0.5787	1.1095	0.2678	ns	LB05	LA05	-0.6135	0.5787	-1.0601	0.2897	ns
LB37	LA15	0.6386	0.5787	1.1036	0.2704	ns	LB12	LB03	-0.6335	0.5787	-1.0948	0.2742	ns
LB32	LA44	0.6278	0.5787	1.0849	0.2786	ns	LB11	LA09	-0.6509	0.5787	-1.1249	0.2613	ns
LB13	LB05	0.6251	0.5787	1.0802	0.2807	ns	LB22	LB37	-0.6621	0.5787	-1.1442	0.2532	ns
LB06	LA44	0.6250	0.5787	1.0801	0.2807	ns	LA14	LA09	-0.6755	0.5787	-1.1673	0.2437	ns
LA15	LA05	0.6233	0.5787	1.0772	0.2820	ns	LA08	LA01	-0.7349	0.5787	-1.2700	0.2048	ns
LB38	LA07	0.6179	0.5787	1.0679	0.2862	ns	LA14	LA05	-0.7394	0.5787	-1.2778	0.2020	ns
LB06	LA01	0.6159	0.5787	1.0643	0.2878	ns	LB15	LB05	-0.7698	0.5787	-1.3303	0.1841	ns
LB33	LA05	0.6132	0.5787	1.0597	0.2899	ns	LB07	LA14	-0.7867	0.5787	-1.3595	0.1747	ns
LB37	LA13	0.6117	0.5787	1.0572	0.2910	ns	LB11	LB07	-0.7956	0.5787	-1.3749	0.1699	ns
LB37	LA02	0.6055	0.5787	1.0463	0.2960	ns	LB12	LB07	-0.8193	0.5787	-1.4158	0.1576	ns
LB13	LB32	0.6030	0.5787	1.0421	0.2980	ns	LB04	LA06	-0.8246	0.5787	-1.4251	0.1549	ns
LB22	LA15	0.5968	0.5787	1.0313	0.3029	ns	LB10	LA44	-0.8272	0.5787	-1.4296	0.1536	ns
LB03	LA03	0.5915	0.5787	1.0222	0.3072	ns	LB03	LA09	-0.8285	0.5787	-1.4319	0.1529	ns
LB38	LA44	0.5809	0.5787	1.0039	0.3160	ns	LA09	LA06	-0.8400	0.5787	-1.4517	0.1473	ns
LA09	LA08	0.5552	0.5787	0.9594	0.3379	ns	LB33	LA13	-0.8600	0.5787	-1.4863	0.1379	ns
LB11	LA06	0.5533	0.5787	0.9562	0.3395	ns	LB38	LA05	-0.8794	0.5787	-1.5198	0.1293	ns
LB15	LB33	0.5521	0.5787	0.9542	0.3405	ns	LB33	LA14	-0.9163	0.5787	-1.5836	0.1140	ns
LB07	LA09	0.5503	0.5787	0.9510	0.3421	ns	LB07	LA44	-0.9802	0.5787	-1.6939	0.0910	ns
LB22	LA02	0.5502	0.5787	0.9509	0.3422	ns	LA15	LA09	-0.9825	0.5787	-1.6980	0.0902	ns
LB10	LB07	0.5468	0.5787	0.9450	0.3452	ns	LB22	LA14	-0.9907	0.5787	-1.7121	0.0876	ns
LA14	LA04	0.5425	0.5787	0.9375	0.3490	ns	LB03	LA41	-1.0556	0.5787	-1.8242	0.0688	ns
LA13	LA04	0.5411	0.5787	0.9352	0.3502	ns	LA44	LA04	-1.0981	0.5787	-1.8977	0.0584	ns
LB33	LB37	0.5317	0.5787	0.9189	0.3587	ns	LB12	LA09	-1.1922	0.5787	-2.0603	0.0400	**

LB15	LA10	0.5314	0.5787	0.9183	0.3590	ns	LB15	LB37	-1.2085	0.5787	-2.0884	0.0373	**
LB12	LA15	0.5295	0.5787	0.9150	0.3607	ns	LB13	LB22	-1.2355	0.5787	-2.1352	0.0333	**
LA14	LA01	0.5250	0.5787	0.9073	0.3648	ns	LB05	LA10	-1.2599	0.5787	-2.1773	0.0300	**
LB05	LB22	0.5164	0.5787	0.8924	0.3727	ns	LA07	LA04	-1.3326	0.5787	-2.3029	0.0218	**
LA41	LA10	0.5128	0.5787	0.8861	0.3760	ns	LB33	LB07	-1.3566	0.5787	-2.3443	0.0195	**
LA15	LA14	0.5084	0.5787	0.8786	0.3801	ns	LB04	LA10	-1.4262	0.5787	-2.4647	0.0141	**
LB04	LA07	0.5019	0.5787	0.8673	0.3863	ns	LB15	LA14	-1.5185	0.5787	-2.6243	0.0090	**
LB07	LA05	0.5003	0.5787	0.8647	0.3877	ns	LB32	LB03	-1.5311	0.5787	-2.6460	0.0084	**
LB37	LA09	0.4989	0.5787	0.8622	0.3891	ns	LB15	LA41	-1.5334	0.5787	-2.6500	0.0083	**
LB38	LB07	0.4935	0.5787	0.8529	0.3942	ns	LA04	LA03	-1.5693	0.5787	-2.7119	0.0070	**
LB11	LB04	0.4925	0.5787	0.8511	0.3952	ns	LB38	LB37	-1.5729	0.5787	-2.7182	0.0068	**
LB10	LA09	0.4825	0.5787	0.8339	0.4048	ns	LA08	LA02	-1.6933	0.5787	-2.9263	0.0036	**
LA44	LA01	0.4817	0.5787	0.8325	0.4056	ns	LB06	LB04	-1.8332	0.5787	-3.1680	0.0016	**
LB38	LB13	0.4809	0.5787	0.8311	0.4064	ns	LA03	LA01	-1.8476	0.5787	-3.1930	0.0015	**
LA06	LA04	0.4782	0.5787	0.8264	0.4090	ns	LB05	LB04	-1.8667	0.5787	-3.2260	0.0014	**
LB38	LB03	0.4718	0.5787	0.8153	0.4154	ns	LA03	LA02	-1.9482	0.5787	-3.3669	0.0008	***
LB13	LA13	0.4664	0.5787	0.8060	0.4207	ns	LA07	LA02	-2.0065	0.5787	-3.4675	0.0006	***
LB07	LA41	0.4652	0.5787	0.8039	0.4219	ns	LB15	LA13	-2.2126	0.5787	-3.8236	0.0002	***
LB10	LA07	0.4627	0.5787	0.7996	0.4244	ns	LA08	LA04	-2.3899	0.5787	-4.1301	0.0000	***
LA14	LA44	0.4609	0.5787	0.7964	0.4262	ns	LA04	LA02	-2.7207	0.5787	-4.7018	0.0000	***
LA41	LA02	0.4581	0.5787	0.7917	0.4289	ns	LB06	LB05	-2.8637	0.5787	-4.9490	0.0000	***
LB06	LB03	0.4520	0.5787	0.7811	0.4351	ns	LA07	LA03	-2.8834	0.5787	-4.9830	0.0000	***
LB13	LA15	0.4510	0.5787	0.7793	0.4362	ns	LB38	LB38	-2.9238	0.5591	-5.2297	0.0000	***
LB06	LA04	0.4464	0.5787	0.7714	0.4409	ns	LA05	LA05	-3.2198	0.5591	-5.7592	0.0000	***
LB32	LA01	0.4412	0.5787	0.7625	0.4462	ns	LA08	LA03	-3.5239	0.5787	-6.0898	0.0000	***
LA44	LA06	0.4361	0.5787	0.7537	0.4515	ns	LA01	LA01	-3.7675	0.5591	-6.7388	0.0000	***
LB07	LA04	0.4354	0.5787	0.7524	0.4522	ns	LA09	LA09	-3.8875	0.5591	-6.9534	0.0000	***
LB03	LA10	0.4341	0.5787	0.7502	0.4536	ns	LA02	LA02	-3.9949	0.5591	-7.1456	0.0000	***
LB12	LA02	0.4335	0.5787	0.7492	0.4541	ns	LB13	LB13	-4.0211	0.5591	-7.1923	0.0000	***
LB12	LA01	0.4285	0.5787	0.7405	0.4594	ns	LA41	LA41	-4.1061	0.5591	-7.3444	0.0000	***
LB32	LA13	0.4246	0.5787	0.7338	0.4635	ns	LB12	LB12	-4.1576	0.5591	-7.4366	0.0000	***
LA41	LA07	0.4190	0.5787	0.7241	0.4694	ns	LA03	LA03	-4.1615	0.5591	-7.4435	0.0000	***
LA44	LA41	0.4059	0.5787	0.7015	0.4834	ns	LA14	LA14	-4.2233	0.5591	-7.5540	0.0000	***
LB15	LB06	0.3948	0.5787	0.6823	0.4954	ns	LA04	LA04	-4.2906	0.5591	-7.6744	0.0000	***
LB38	LA41	0.3913	0.5787	0.6762	0.4992	ns	LB05	LB05	-4.2966	0.5591	-7.6851	0.0000	***
LB04	LA44	0.3906	0.5787	0.6749	0.5001	ns	LB03	LB03	-4.3351	0.5591	-7.7540	0.0000	***
LA10	LA08	0.3877	0.5787	0.6699	0.5033	ns	LA10	LA10	-4.3753	0.5591	-7.8260	0.0000	***
LB32	LA05	0.3832	0.5787	0.6622	0.5082	ns	LA44	LA44	-4.3881	0.5591	-7.8489	0.0000	***
LB33	LB22	0.3819	0.5787	0.6601	0.5096	ns	LB04	LB04	-4.4303	0.5591	-7.9243	0.0000	***
LA07	LA01	0.3793	0.5787	0.6555	0.5125	ns	LB22	LB22	-4.4504	0.5591	-7.9604	0.0000	***
LB07	LB04	0.3772	0.5787	0.6518	0.5149	ns	LA07	LA07	-4.5613	0.5591	-8.1586	0.0000	***

LB38	LB22	0.3672	0.5787	0.6347	0.5260	ns	LB37	LB37	-4.6937	0.5591	-8.3955	0.0000	***
LA09	LA01	0.3615	0.5787	0.6248	0.5324	ns	LB06	LB06	-4.7158	0.5591	-8.4349	0.0000	***
LB06	LA08	0.3576	0.5787	0.6179	0.5370	ns	LB15	LB15	-4.7853	0.5591	-8.5593	0.0000	***
LB13	LA04	0.3572	0.5787	0.6174	0.5373	ns	LB07	LB07	-4.9978	0.5591	-8.9394	0.0000	***
LB03	LB22	0.3554	0.5787	0.6142	0.5394	ns	LB11	LB11	-5.1997	0.5591	-9.3006	0.0000	***
LB13	LA01	0.3541	0.5787	0.6119	0.5409	ns	LA13	LA13	-5.2014	0.5591	-9.3035	0.0000	***
LB13	LA02	0.3537	0.5787	0.6112	0.5414	ns	LA06	LA06	-5.3930	0.5591	-9.6462	0.0000	***
LB05	LB03	0.3534	0.5787	0.6108	0.5417	ns	LB33	LB33	-5.5029	0.5591	-9.8429	0.0000	***
LB33	LA10	0.3461	0.5787	0.5982	0.5500	ns	LB32	LB32	-5.7313	0.5591	-10.251	0.0000	***
LB03	LA08	0.3454	0.5787	0.5969	0.5509	ns	LA15	LA15	-5.7878	0.5591	-10.352	0.0000	***
LA14	LA10	0.3376	0.5787	0.5835	0.5599	ns	LB10	LB10	-5.8679	0.5591	-10.495	0.0000	***
LB13	LB03	0.3368	0.5787	0.5820	0.5609	ns	LA08	LA08	-6.5405	0.5591	-11.698	0.0000	***
LB03	LA02	0.3306	0.5787	0.5712	0.5681	ns							

Referencias Bibliográficas

- Adu, G. B., Badu-Apraku, B., Akromah, R., & Awuku, F. J. (2022). Combining Abilities and Heterotic Patterns among Early Maturing Maize Inbred Lines under Optimal and Striga-Infested Environments. *Genes*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/genes13122289>
- Adu, G. B., Badu-Apraku, B., Akromah, R., Garcia-Oliveira, A. L., Awuku, F. J., & Gedil, M. (2019). Genetic diversity and population structure of early-maturing tropical maize inbred lines using SNP markers. *PLoS ONE*, 14(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214810>
- Aguiar, C. G., Schuster, I., Amaral, A. T., Scapim, C. A., & Vieira, E. S. N. (2008). Heterotic groups in tropical maize germplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 7(4), 1233–1244. <https://doi.org/10.4238/vol7-4gmr495>
- Alika, J. E., Aken'ova, M. E., & Fatokun, C. A. (1993). Variation among maize (*Zea mays* L.) accessions of Bendel State, Nigeria. Multivariate analysis of agronomic data. In *Euphytica* (Vol. 66).
- Al-Naggar, A. M. M., Shafik, M. M., & Musa, R. Y. M. (2020). Genetic Diversity Based on Morphological Traits of 19 Maize Genotypes Using Principal Component Analysis and GT Biplot. *Annual Research & Review in Biology*, 68–85. <https://doi.org/10.9734/arrb/2020/v35i230191>
- Al-samarai, R., & Al-Kazaz, A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Awata, L. A. O., Tongoona, P., Danquah, E., Efie, B. E., & Marchelo-Dragna, P. W. (2018). Common Mating Designs in Agricultural Research and Their Reliability in Estimation of Genetic Parameters. 11(7), 16–36. <https://doi.org/10.9790/2380-1107021636>

- Badu-Apraku, B., Annor, B., Oyekunle, M., Akinwale, R. O., Fakorede, M. A. B., Talabi, A. O., Akaogu, I. C., Melaku, G., & Fasanmade, Y. (2015). Grouping of early maturing quality protein maize inbreds based on SNP markers and combining ability under multiple environments. *Field Crops Research*, *183*, 169–183. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.07.015>
- Badu-Apraku, B., Oyekunle, M., Fakorede, M. A. B., Vroh, I., O Akinwale, R., & Aderounmu, M. (2013). Combining ability, heterotic patterns and genetic diversity of extra-early yellow inbreds under contrasting environments. *Euphytica*, *192*(3), 413–433. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0876-4>
- Barata, C., & Carena, M. J. (2006). Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups based on molecular and testcross data. *Euphytica*, *151*(3), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9155-y>
- Barroso, P. A., Medeiros, A. M., Santos, N. P. S. dos, Silva, D. C. Q., Silva, S. da C., & Gomes, R. L. F. (2019). Phenotypic Dispersion of Landrace Lima Bean Varieties Using Multidimensional Scaling. *Journal of Agricultural Science*, *11*(13), 178. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n13p178>
- Begum, S., Alam, S. S., Omy, S. H., Amiruzzaman, M., & Rohman, M. M. (2018). Inheritance and combining ability in maize using a 7x7 diallel cross. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *10*(9), 239–248. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2018.0750>
- Beiragi, M. A., Siah Sar, B. A., Sadeghi Geive, H., Nasrolah Alhossini, M., Rahmani, A., & Bakhtiari Gharibdoosti, A. (2012). Application of the multivariate analysis method for some traits in maize. *AFRICAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, *7*(10). <https://doi.org/10.5897/ajar11.1595>
- Bello, O. B., Abdulmalik, S. Y., & Ige. (2010). Correlation and path coefficient analysis of yield and agronomic characters among open pollinated maize varieties and their F 1 hybrids in a diallel cross. *African Journal of Biotechnology*, *9*(18), 2633–2639. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Beyene, T., Botha, A. M., & Myburg, A. A. (2005). Phenotypic diversity for morphological and agronomic traits in traditional ethiopian highland maize accessions. *South African Journal of Plant and Soil*, *22*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1080/02571862.2005.10634689>
- Bfinziger, M., & Lafitte, H. R. (1997). Efficiency of Secondary Traits for Improving Maize for Low-Nitrogen Target Environments. *Crop Science*, *37*.

- Bidhendi, M., Mostafavi, K., Choukan, R., Darvish, F., & Majidi, E. (2009). Classifying of maize inbred lines into heterotic groups using diallel analysis. *World Acad Sci Eng Technol*, 6(7), 1161–1164.
- Birchler, J. A., Auger, D. L., & Riddle, N. C. (2003). In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *Plant Cell*, 15(10), 2236–2239. <https://doi.org/10.1105/tpc.151030>
- Borg, I., & Groenen, P. (2005). *Modern Multidimensional Scaling: Theory and Applications*. Springer-Verlag.
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Chandel, U., Kumar, D., & Guleria, S. K. (2019). Combining ability effects and heterotic grouping in newly developed early maturing yellow maize (*Zea mays* L.) inbreds under sub-tropical conditions. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 10(3), 1049–1059. <https://doi.org/10.5958/0975-928X.2019.00134.0>
- Chengsong, Z., & Jianming, Y. (2009). Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in association mapping with different sample types. *Genetics*, 182(3), 875–888. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098863>
- Ching, A., Caldwell, K. S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O. S., Tingey, S., Morgante, M., & Rafalski, A. J. (2002). *SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines*. <http://www.arabidopsis.org/cereon/>.
- Christie, B. R., & Shattuck, V. I. (2010). The Diallel Cross: Design, Analysis, and Use for Plant Breeders. *Plant Breeding Reviews*, 9(736), 9–36. <https://doi.org/10.1002/9780470650363.ch2>
- da Silva, A. R., Cecon, P. R., Días, C. T. dos S., Puiatti, M., Finger, F. L., & Souza Carneiro, A. P. (2014). Morphological phenotypic dispersion of garlic cultivars by cluster analysis and multidimensional scaling. *Scientia Agricola*, 71(1), 38–43.
- Derera, J., Tongoona, P., Vivek, B. S., & Laing, M. D. (2008). Gene action controlling grain yield and secondary traits in southern African maize hybrids under drought and non-drought environments. *Euphytica*, 162(3), 411–422. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9582-4>
- Duitama, J., Quintero, J. C., Cruz, D. F., Quintero, C., Hubmann, G., Foulquié-Moreno, M. R., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M., & Tohme, J. (2014). An

- integrated framework for discovery and genotyping of genomic variants from high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, 42(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1381>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- El-Badawy, M. E. M. (2013). Heterosis and combining ability in maize using diallel crosses among seven new inbred lines. *Asian Journal of Crop Science*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.3923/ajcs.2013.1.13>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Fan, X. M., Bi, Y., Zhang, Y., Jeffers, D., Yin, X., & Kang, M. (2018). Improving breeding efficiency of a hybrid maize breeding program using a three heterotic-group classification. *Agronomy Journal*, 110(4), 1209–1216. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.05.0290>
- Fan, X. M., Zhang, Y. M., Yao, W. H., Chen, H. M., Tan, J., Xu, C. X., Han, X. L., Luo, L. M., & Kang, M. S. (2009). Classifying maize inbred lines into heterotic groups using a factorial mating design. *Agronomy Journal*, 101(1), 106–112. <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0217>
- Fondo Nacional Cerealista, & FENALCE, F. N. de C. de C. (2011). *Aspectos técnicos de la producción de maíz en Colombia*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19418>.
- Fonseca, A. E., Westgate, M. E., Grass, L., & Dornbos, D. L. (2003). Tassel Morphology as an Indicator of Potential Pollen Production in Maize. *Crop Management*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1094/cm-2003-0804-01-rs>
- Govaerts, B., Vega, D., Chávez, X., Narro, L., San Vicente, F., Palacios, N., Pérez, M., González, G., Ortega, P., Carvajal, A., Arcos, A. L., Bolaños, J., Romero, N., Bolaños, J., Vanegas, Y. F., Echeverría, R., Jarvis, A., Jiménez, D., & Ramírez-Villegas, J. (2019). *Maíz para Colombia: Visión 2030*.
- Griffing, B. (1956). Concept of General and Specific Combining Ability in Relation to Diallel Crossing Systems. *Australian Journal of Biological Sciences*, 9(4), 463. <https://doi.org/10.1071/bi9560463>

- Hallauer, A. R. (2015). *Heterosis What Have We Learned? What Have We Done? Where Are We Headed?* 1922, 483–492. <https://doi.org/10.2134/1999.geneticsandexploitation.c45>
- Hassan, W. A., Hadi, B. H., & Hamdalla, M. S. H. (2020). Study The GCA and SCA Effects of Five Inbred Lines of Maize According to Half Diallel Mating System. In *Journal For Agriculture Sciences (QJAS)* (Vol. 10, Issue 2). <https://jouagr.qu.edu.iq/>
- Hussain, M., Shah, K. N., Ghafoor, A., Kiani, T. T., & Mahmood, T. (2014). GENETIC ANALYSIS FOR GRAIN YIELD AND VARIOUS MORPHOLOGICAL TRAITS IN MAIZE (ZEA MAYS L.) UNDER NORMAL AND WATER STRESS ENVIRONMENTS. In *J. Anim. Plant Sci* (Vol. 24, Issue 4).
- Jamshidian, P., Reza Golparvar, A., Naderi, M. R., Darkhal, H., & Golparvar, A. R. (2013). International Journal of Farming and Allied Sciences Phenotypic correlations and path analysis between ear yield and other associated characters in corn hybrids (*Zea mays* L.). *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2, 1273–1276. www.ijfas.com
- Ji, H. C., Cho, J.-W., & Yamakawa, T. (2006). Diallel Analysis of Plant and Ear Heights in Tropical Maize (*Zea mays* L.). In *J. Fac. Agr., Kyushu Univ* (Vol. 51, Issue 2).
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Khakwani, K., Cengiz, R., Asif, M., & Ahsan, M. (2020). Heterotic and heritability pattern of grain yield and related traits in doubled haploid f1 hybrids of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*. <https://www.researchgate.net/publication/347986397>
- Labroo, M. R., Studer, A. J., & Rutkoski, J. E. (2021). Heterosis and Hybrid Crop Breeding: A Multidisciplinary Review. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.643761>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, H., Qu, W., Obrycki, J. J., Meng, L., Zhou, X., Chu, D., & Li, B. (2020). Optimizing sample size for population genomic study in a global invasive lady beetle, *harmonia axyridis*. *Insects*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/insects11050290>

- Li, Q., Yang, X., Xu, S., Cai, Y., Zhang, D., Han, Y., Li, L., Zhang, Z., Gao, S., Li, J., & Yan, J. (2012). Genome-wide association studies identified three independent polymorphisms associated with α -tocopherol content in maize kernels. *PLoS One*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036807>
- 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(4), 2117–2128.
- Liu, N., Xue, Y., Guo, Z., Li, W., & Tang, J. (2016). Genome-wide association study identifies candidate genes for starch content regulation in Maize Kernels. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01046>
- Lu, X., Zhou, Z., Yuan, Z., Zhang, C., Hao, Z., Wang, Z., Li, M., Zhang, D., Yong, H., Han, J., Li, X., & Weng, J. (2020). Genetic Dissection of the General Combining Ability of Yield-Related Traits in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00788>
- Mahato, A., Shahi, J. P., Singh, P. K., Kumar, M., & Singamsetti, A. (2021). Heterotic grouping of sweet corn (*Zea mays* var. sachharata) genotypes based on their combining ability and molecular diversity. *Article in Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.81.3.8>
- Maruthi, R. R. N. G. J. S. B. C. G. K. (2019). Heterotic grouping of late-maturing maize inbred lines based on combining ability and molecular marker studies. *Journal of Environmental Biology*, 40, 705–710.
- Medici, L. O., Pereira, M. B., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2004). Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. *Journal of Agricultural Science*, 142(5), 535–541. <https://doi.org/10.1017/S002185960400468X>
- Meena, A. K., Gurjar, D., Patil, S. S., & Kumhar, B. L. (2017). Concept of Heterotic Group and its Exploitation in Hybrid Breeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 61–73. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.007>
- Melchinger, A. E., & Gumber, R. K. (1998). Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants. In *CSSA Special Publication (Issue 25)*.
- Menkir, A., Melake-Berhan, A., The, C., Ingelbrecht, I., & Adepoju, A. (2004). Grouping of tropical mid-altitude maize inbred lines on the basis of yield data

- and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1582–1590.
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1585-0>
- Messmer, R., Fracheboud, Y., Bänziger, M., Vargas, M., Stamp, P., & Ribaut, J. M. (2009). Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5), 913–930.
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-1099-x>
- Mhike, X., Lungu, D. M., & Vivek, B. (2011). Combining ability studies amongst AREX and CIMMYT maize (*Zea mays* L.) inbred lines under stress and non stress conditions. In *African Journal of Agricultural Research* (Vol. 6, Issue 8).
<http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Murtadha, M. A., Ariyo, O. J., & Alghamdi, S. S. (2018). Analysis of combining ability over environments in diallel crosses of maize (*Zea mays*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1), 69–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.01.004>
- Nardino, M., Carvalho, I. R., Barros, W. S., Souza, V. Q. De, Corazza, T., Koch, F., Aisenberg, G., Aumonde, T. Z., Pedó, T., Szareski, V. J., & Demari, G. H. (2016). DIALLEL CROSS ANALYSIS IN MAIZE. *International Journal of Current Research*, 8(08), 35686–35692.
- Nazareno, A. G., Bemmels, J. B., Dick, C. W., & Lohmann, L. G. (2017). Minimum sample sizes for population genomics: an empirical study from an Amazonian plant species. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1136–1147.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12654>
- Nei, M. (1972). *Genetic Distance between Populations*. 106(949), 283–292.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Nyaligwa, L., Hussein, S., Amelework, B., & Ghebrehi-Wot, H. (2015). Genetic diversity analysis of elite maize inbred lines of diverse sources using SSR markers. *Maydica*, 60(3). <http://www.agron.missouri.edu>
- Olutayo Akinwale, R. (2021). *Cereal Grains* (A. K. Goyal, Ed.; Vol. 2).
- Oyetunde, O. A., Badu-Apraku, B., Ariyo, O. J., & Alake, C. O. (2020). Efficiencies of Heterotic Grouping Methods for Classifying Early Maturing Maize Inbred Lines. *Agronomy*, 10(8).
<https://doi.org/10.3390/agronomy10081198>
- Paterniani, M. E. A. G. Z., Sawazaki, E., Dudienas, C., Duarte, A. P., & Gallo, P. B. (2000). Diallel crosses among maize lines with emphasis on resistance to foliar

- diseases. *Genetics and Molecular Biology*, 23(2), 381–385.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000200024>
- Pereira, V., & Gusmão, L. (2013). X-Chromosome Markers. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition*, 257–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00047-7>
- Pinto, R. D. M. C., De Souza, C. L., Carlini-Garcia, L. A., Garcia, A. A. F., & Pereira De Souza, A. (2003). Comparison between molecular markers and diallel crosses in the assignment of maize lines to heterotic groups. In *Maydica* (Vol. 48, Issue 1, pp. 63–73).
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Á., & Lareu, M. V. (2013). An overview of STRUCTURE: Applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4(MAY). <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>
- Pritchard, J., Stephens, M., Rosenberg, N., & Donnelly, P. (2000). Association Mapping in Structured Populations. *American Journal of Human Genetics*, 67, 170–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/302959>
- Pswarayi, A., & Vivek, B. (2008). Combining ability of CIMMYT's early maturing maize (*Zea mays* L.) germplasm under stress and non-stress conditions and identification of testers. *Euphytica*, 162, 353–362. www.fao.org
- Reif, J. C., Gumpert, F. M., Fischer, S., & Melchinger, A. E. (2007). Impact of interpopulation divergence on additive and dominance variance in hybrid populations. *Genetics*, 176(3), 1931–1934. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074146>
- Reif, J. C., Melchinger, A. E., Xia, X. C., Warburton, M. L., Hoisington, D. A., Vasal, S. K., Srinivasan, G., Bohn, M., & Frisch, M. (2003). Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. *Crop Science*, 43(4), 1275–1282. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1275>
- Revilla, P., Butron, A., Malvar, R. A., & Ordas, A. (1999). Relationships among Kernel Weight, Early Vigor, and Growth in Maize. *Crop Sci.*, 39, 654–658.
- Ricci, G. C. L., Silva, N., Pagliarini, M. S., & Scapim, C. A. (2007). Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Research*, 6(4), 1013–1018.
- Richard, C., Osiru, D., Mwala, M., & Lubberstedt, T. (2016). Genetic diversity and heterotic grouping of the core set of southern African and temperate maize (*Zea mays* L) Inbred lines using SNP markers. In *Maydica electronic publication* (Vol.

- 61, Issue 1). [Istituto sperimentale per la cerealicoltura, Section of Bergamo, Italy]. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1513>
- Rodríguez, F., Alvarado, G., Pacheco, Á., Crossa, J., & Burgueño, J. (2015). AGD-R (Analysis of Genetic Designs with R for Windows) Version 5.0. *CIMMYT Research Data & Software Repository Network*, 14.
- Romay, M. C., Millard, M. J., Glaubitz, J. C., Peiffer, J. A., Swarts, K. L., Casstevens, T. M., Elshire, R. J., Acharya, C. B., Mitchell, S. E., Flint-Garcia, S. A., McMullen, M. D., Holland, J. B., Buckler, E. S., & Gardner, C. A. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. *Genome Biology*, 14(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r55>
- RStudio Team. (2022). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. [Http://Www.Rstudio.Com/](http://www.Rstudio.com/).
- Salgar, L. M. (2004, November). El cultivo de maíz en Colombia. *Revista Semillas*, 2–7.
- Santos De Oliveira, L., Schuster, I., Novaes, E., & Pereira, W. A. (2021). SNP genotyping for fast and consistent clustering of maize inbred lines into heterotic groups SNP genotyping for fast and consistent clustering of maize inbred lines into heterotic groups ARTICLE. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21(1), 367121110. <https://doi.org/10.1590/1984>
- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Genome mapping. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, 77–93. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.77>
- Shahrokhi, M., Khorasani, S. K., & Ebrahimi, A. (2013). Study of genetic components in various maize (*Zea mays* L.) traits, using generation mean analysis method. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(3), 405–412. <http://www.ijappjournal.com>
- Shi, W., Ayub, Q., Vermeulen, M., Shao, R. G., Zuniga, S., Van Der Gaag, K., De Knijff, P., Kayser, M., Xue, Y., & Tyler-Smith, C. (2010). A worldwide survey of human male demographic history based on Y-SNP and Y-STR data from the HGDP-CEPH populations. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 385–393. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp243>
- Shu, G., Cao, G., Li, N., Wang, A., Wei, F., Li, T., Yi, L., Xu, Y., & Wang, Y. (2021). Genetic variation and population structure in China summer maize germplasm. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84732-6>

- Shull, G. H. (1952). Beginnings of the heterosis concept. In *J.W. Gowen (ed.) Heterosis* (pp. 14–48). Iowa State Univ. Press. Ames.
- Silva, K. J., Guimarães, C. T., Guilhen, J. H. S., Guimarães, P. E. de O., Parentoni, S. N., Trindade, R. dos S., de Oliveira, A. A., Bernardino, K. da C., Pinto, M. de O., Dias, K. O. das G., Bernardes, C. de O., Dias, L. A. dos S., Guimarães, L. J. M., & Pastina, M. M. (2020). High-density SNP-based genetic diversity and heterotic patterns of tropical maize breeding lines. *Crop Science*, *60*(2), 779–787. <https://doi.org/10.1002/csc2.20018>
- Singh, S., & Gupta, S. K. (2019). Formation of heterotic pools and understanding relationship between molecular divergence and heterosis in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). *PLoS ONE*, *14*(5).
- Sprague, G. F., & Tatum, L. A. (1942). General vs. Specific Combining Ability in Single Crosses of Corn1. *Agronomy Journal*, *34*(10), 923–932. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/agronj1942.00021962003400100008x>
- Stanley, A., Menkir, A., Paterne, A., Ifie, B., Tongoona, P., Unachukwu, N., Meseke, S., Mengesha, W., & Gedil, M. (2020). *Genetic Diversity and Population Structure of Maize Inbred Lines with Varying Levels of Resistance to*.
- UGRA, U. de G. de R. Agropecuarios. (2018). Ficha de inteligencia: maíz tecnificado. *FINAGRO*.
- van Inghelandt, D., Melchinger, A. E., Lebreton, C., & Stich, B. (2010). Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *120*(7), 1289–1299. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1256-2>
- Viveros Barrera, J. S. (2016). El maíz en la economía rural colombiana. *El Cerealista*, *125*(58), 6–9.
- Wang, X., Zhang, Z., Xu, Y., Li, P., Zhang, X., & Xu, C. (2020). Using genomic data to improve the estimation of general combining ability based on sparse partial diallel cross designs in maize. *Crop Journal*, *8*(5), 819–829. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.04.012>
- Ward, J. H. Jr. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, *58*(301), 236–244.
- Weir, B. S., & Goudet, J. (2017). A unified characterization of population structure and relatedness. *Genetics*, *206*(4), 2085–2103. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.198424>

- White, O. E. (1917). Inheritance of Endosperm Color in Maize. In *Source: American Journal of Botany* (Vol. 4, Issue 7).
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer, Ed.; 2nd ed.).
- Xia, X. C., Reif, J. C., Melchinger, A. E., Frisch, M., Hoisington, D. A., Beck, D., Pixley, K., & Warburton, M. L. (2005). Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: II. Subtropical, tropical midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize. *Crop Science*, *45*(6), 2573–2582. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0246>
- Xu, C., Ren, Y., Jian, Y., Guo, Z., Zhang, Y., Xie, C., Fu, J., Wang, H., Wang, G., Xu, Y., Li, P., & Zou, C. (2017). Development of a maize 55 K SNP array with improved genome coverage for molecular breeding. *Molecular Breeding*, *37*(3). <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0622-z>
- Yousuf, M., & Saleem, M. (2002). Estimates of Heritability for Some Quantitative Characters in Maize Coordination and development activities regarding Rice, Maize, Sorghum, Millet and Fodder Crops View project Development of Rice Hybrids for Different Rice Growing Ecologies of Pakistan View project Estimates of Heritability for Some Quantitative Characters in Maize. In *Article in International Journal of Agriculture and Biology · INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*. <http://ijab.org>
- Zhang, X., Zhang, H., Li, L., Lan, H., Ren, Z., Liu, D., Wu, L., Liu, H., Jaqueth, J., Li, B., Pan, G., & Gao, S. (2016). Characterizing the population structure and genetic diversity of maize breeding germplasm in Southwest China using genome-wide SNP markers. *BMC Genomics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3041-3>
- Zhao, J., Li, C., Song, W., Wang, Y., Zhang, R., Wang, J., Wang, F., Tian, H., & Wang, R. (2018). Genetic diversity and population structure of important Chinese maize breeding germplasm revealed by SNP-chips. *Scientia Agricultura Sinica*, *51*(4), 626–634. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2018.04.003>