
EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS PARENTALES DE HÍBRIDOS DE MAÍZ (*Zea mays* L) EN TRES AMBIENTES DE VENEZUELA

Alexander Hernández, Félix San Vicente y Rosana Figueroa-Ruiz

RESUMEN

Se caracterizaron y evaluaron líneas parentales de híbridos de maíz (*Zea mays* L) de la Fundación Danac, Venezuela, con un nivel de endogamia S_3 - S_4 . Las evaluaciones de comportamiento agronómico fueron realizadas en tres localidades durante la época de lluvias. Los análisis de la varianza fueron realizados por ambiente y al comprobar la homogeneidad de las varianzas se realizó un análisis combinado. El ordenamiento de las líneas en función del rendimiento permitió evidenciar que las líneas 7 y 1 fueron las de mejor comportamiento y las líneas 13 y 5 las peores. Las líneas mostraron diferencias en cada uno de los ambientes evaluados, siendo la localidad de Sabana de Parra la de mejor rendimiento de grano promedio con 2154,70 kg-ha⁻¹. La localidad de Las Guacamayas es la que

mas afectó el comportamiento de las líneas para esta característica, mostrando un valor promedio de 1688,7 kg-ha⁻¹. El ordenamiento en función del rendimiento de endospermo indicó que las líneas con mejor comportamiento fueron la 10, 11, 12 y 13, con valores >76,14% y peso específico >756,5 kg-hl⁻¹. En los análisis de distancia genética, utilizando marcadores RAPD y SSR hubo coincidencia en la clasificación y ordenación de las líneas. Los resultados permitieron agrupar las líneas en dentadas y duras, en coincidencia con la clasificación que en la práctica realizan los mejoradores. Sin embargo, la clasificación basada en RAPD fue menos discriminante que la obtenida mediante SSR. Los datos moleculares confirmaron la información del pedigrí.

EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF MAIZE (*Zea mays* L) PARENTAL INBRED LINES IN THREE ENVIRONMENTS OF VENEZUELA

Alexander Hernández, Félix San Vicente and Rosana Figueroa-Ruiz

SUMMARY

Maize (*Zea mays* L) parental inbred lines with S_3 - S_4 inbreeding level from Fundación Danac, Venezuela, were evaluated and characterized. Agronomic performance evaluations were conducted during the rainy season in three locations. Analysis of variance were calculated on individual and combined across environment data. Line ranking, based on grain yield, showed that lines 7 and 1 were the best performers, while lines 13 and 5 were the poorest. The lines performed differently in the tested environments. Sabana de Parra, was the highest yielding environment (2154.70 kg-ha⁻¹). Las Guacamayas, with 1688.7 kg-ha⁻¹

was the lowest yielding environment. Line ranking, based on endosperm yield; indicated that best performing lines were 10, 11, 12 y 13, with values >76.14% and specific weight >756.5 kg-hl⁻¹. Genetic distance analysis using SSR and RAPD markers coincided in classifying lines. Results allowed us to group together dent and flint lines; in concordance with breeder's practical classification. However, grouping based on RAPD markers was less discriminating than the obtained with SSR markers. Molecular data confirmed pedigree information.

Introducción

En Venezuela, la producción de maíz es la más importante dentro del grupo de los cereales, tanto en volumen como en valor de producción. El 70% de la producción nacio-

nal se concentra en los llanos occidentales, centrales y en el valle medio del río Yaracuy. La mayor producción, 35% del total, se obtiene en el estado Portuguesa, seguido por los estados Guárico, Barinas y Yaracuy. De la producción

se destina el 80% a la fabricación de harinas precocidas y 95% del área de producción se siembra con híbridos (San Vicente *et al.*, 2004; Fedea-gr, 2009).

El rendimiento de un híbrido simple depende de la

acción génica aditiva, dominante y epistática, cuando se hace el ensamblaje respectivo. Al evaluar el comportamiento *per se* de las líneas, se puede conocer la contribución de los efectos aditivos en el híbrido; pero no los efectos

PALABRAS CLAVE / Evaluación de Parentales / Líneas / *Zea mays* /

Recibido: 25/05/2009. Modificado: 07/03/2010. Aceptado: 09/03/2010.

Alexander J. Hernández J. Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado (UCLA),

Venezuela. Dirección: Postgrado de Agronomía, UCLA. Vía Redoma de Agua Viva frente Urbanización Terepaima. Cabudare, estado Lara, Apdo. 400, Barquisimeto, Venezuela. e-mail: ahernandez@ucla.edu.ve

Félix M. San Vicente G. Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. Ph.D. en Mejoramiento de Plantas, Iowa State University, EEUU. Investigador V, INIA-CENIAP, Venezuela. e-mail: fsanvicente@inia.gob.ve

Rosana Figueroa-Ruiz. Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. Ph.D. en Mejoramiento Genético de Plantas, University of Minnesota, EEUU. Profesora, UCV, Venezuela. e-mail: figueror@agr.ucv.ve

AVALIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAS PARENTAIS DE HÍBRIDOS DE MILHO (*Zea mays* L) EM TRÊS AMBIENTES DA VENEZUELA

Alexander Hernández, Félix San Vicente e Rosana Figueroa-Ruiz

RESUMO

Caracterizaram-se e avaliaram linhas parentais de híbridos de milho (*Zea mays* L) da Fundação Danac, Venezuela, com um nível de endogamia S_3 - S_4 . As avaliações de comportamento agrônomico foram realizadas em três localidades durante a época de chuvas. As análises da variância foram realizadas por ambiente e ao comprovar a homogeneidade das variâncias foi realizada uma análise combinada. O ordenamento das linhas em função do rendimento permitiu evidenciar que as linhas 7 e 1 foram as de melhor comportamento e as linhas 13 e 5 as piores. As linhas mostraram diferenças em cada um dos ambientes avaliados, sendo a localidade de Sabana de Parra a de melhor rendimento de grão médio com 2154,70kg-ha⁻¹. A localidade de Las Guacamayas

é a que mais afetou o comportamento das linhas para esta característica, mostrando um valor médio de 1688,7kg-ha⁻¹. O ordenamento em função do rendimento de endospermo indicou que as linhas com melhor comportamento foram a 10, 11, 12 e 13, com valores >76,14% e peso específico >756,5kg-hl⁻¹. Nas análises de distância genética, utilizando marcadores RAPD e SSR houve coincidência na classificação e ordenação das linhas. Os resultados permitiram agrupar as linhas em dentadas e duras, em coincidência com a classificação que na prática realizam os melhoradores. Entretanto, a classificação baseada em RAPD foi menos discriminante que a obtida mediante SSR. Os dados moleculares confirmaram a informação do pedigrí.

epistáticos y de dominancia. El uso de los marcadores moleculares para estimar la divergencia genética entre pares de líneas mejoradas ha sido sugerido como una medida para superar este inconveniente, y permitir la identificación y predicción del comportamiento de híbridos simples (Lanza *et al.*, 1997; Bernardo, 2001; Warburton *et al.*, 2002).

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

Conforme a lo planteado, la realización de los cruces convencionales debe apoyar-

se con estas técnicas para obtener híbridos de alto rendimiento. Al respecto, Xia *et al.* (2004) indicaron que el conocimiento de la diversidad genética entre el germoplasma es importante para la producción de maíz híbrido. Esta información es útil al momento de planear cruces entre germoplasma élite, al desarrollar nuevas líneas endocriadas y al asignar genotipos a determinados grupos heteróticos. La diversidad genética puede ser determinada por caracterización molecular (Bernardo, 2001; Warburton *et al.*, 2002).

Los RAPD (por las siglas inglesas de *random amplification of polymorphic DNA*) son marcadores genéticos que combinan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el anclaje al azar de iniciadores o *primers* no específicos (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Debido a su simplicidad y eficiencia, los marcadores RAPD han sido propuestos para estimar la divergencia genética entre genotipos (Jain *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1994).

Lanza *et al.* (1997), evaluaron la diversidad genética de 18 líneas mejoradas de maíz y determinaron la correlación entre distancia genética y el comportamiento de los híbridos simples usando RAPD. Los resultados indicaron que

los RAPD pueden ser usados como una herramienta para determinar la magnitud de la diversidad genética en líneas mejoradas de maíz tropical, además de identificar genotipos dentro de diferentes grupos, apoyando la elección de los cruces superiores que se pueden hacer con líneas mejoradas, lo cual permite reducir el número de cruces requeridos que deben ser evaluados en campo.

Las poblaciones tropicales están usualmente compuestas de gran variabilidad en contraste con las sintéticas de las zonas templadas. En consecuencia, las líneas que se obtienen de poblaciones tropicales son mucho más variables, razón por la cual los marcadores moleculares son muy útiles en la evaluación de su variabilidad genética (Lanza *et al.*, 1997).

Los microsatélites SSR (de *short sequence repeat*) son secuencias pequeñas, de 1 a 4 nucleótidos, que se repiten en bloques y ocurren de manera abundante en el genoma eucariota. Estas regiones pueden ser amplificadas por PCR mediante el uso de pares de *primers* especialmente diseñados, de 20-30 bases, complementarias a las secuencias únicas que limitan o flanquean la región repetitiva. Estos marcadores muestran un elevado nivel de polimorfismo debido a la variación en la longitud de la unidad

repetitiva (IPGRI, 1996; Peñera *et al.*, 2002).

Pejic *et al.* (1998), compararon técnicas para evaluar la información y la aplicabilidad en estudios de diversidad genética en un grupo de 33 líneas de maíz. Los marcadores utilizados fueron diferentes en cuanto al polimorfismo detectado. El contenido de la información, medido por la heterocigosis esperada y el número promedio de alelos, fue superior para SSRs, mientras que el menor nivel de polimorfismo fue obtenido con AFLP (de *amplified fragment length polymorphism*). Sin embargo, los AFLPs, resultaron más eficientes, ya que tuvieron la capacidad de revelar mayor cantidad de bandas en una sola amplificación. De hecho, la prueba de índice de eficiencia fue diez veces superior al comparar los AFLPs con los otros métodos. A excepción del los RAPDs, los dendrogramas de similitud genética fueron altamente similares. Los marcadores SSR y AFLP pueden remplazar a los marcadores RFLP (de *restriction fragment length polymorphism*) en los estudios de similitud genética, ya que son comparables en cuanto a la caracterización de líneas seleccionadas por pedigrí.

Gethi *et al.* (2002) estimaron el nivel de diversidad genética entre y dentro de

líneas de diferentes fuentes mediante marcadores SSR. Estos autores utilizaron seis líneas puras, B73, CM105, Mo17, Oh43, W153R y Wf9, obtenidas de 14 programas de mejoramiento; y concluyeron que aunque exista mayor diversidad entre que dentro de líneas, una pequeña cantidad pero significativa de la variación existente es atribuida a la fuente u origen de la semilla dentro del proceso de multiplicación. Tal variación puede haber surgido por diferencias en el mantenimiento de semilla, ya que no encontraron ninguna prueba que sugirieran altas tasas de mutación o recombinación.

El objetivo de este estudio fue caracterizar y evaluar líneas parentales de maíz respecto a caracteres agronómicos, molineros y moleculares.

Materiales y Métodos

Material genético en estudio

Después de evaluar un grupo de líneas del banco de germoplasma de la Fundación para la Investigación Agrícola Danac, San Javier, estado Yaracuy, Venezuela, fueron seleccionadas 14 líneas que presentaban un nivel de endogamia S_3 - S_4 blancas, 7 dentadas y 7 duras, en base a evaluación visual y de pedigrí. Todas las líneas seleccionadas provienen de poblaciones de origen diverso (Tabla I).

Estudio agronómico y de calidad de grano

El experimento en que las líneas fueron sembradas se estableció en la época de siembra convencional, en tres localidades: San Javier, estado Yaracuy (10°21'51"N y 68°39'00"O, 100msnm); Las Guacamayas, estado Guarín (9°11'N y 66°58'O, 140msnm) y Sabana de Parra, estado Yaracuy (340msnm 10°05'48"N y 69°01'36"O). Se utilizaron prácticas agronómicas convencionales de acuerdo a la localidad. Las 14 líneas fueron sembradas en un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por dos surcos de 5m para cada material, con un espacio de 20cm entre plantas y 80cm entre surcos, lo cual representó una densidad de siembra de ~62500 plantas/ha.

Los caracteres agronómicos medidos en campo fueron rendimiento del grano, días a floración masculina y femenina, altura de mazorca y planta, acame de raíz y de tallo, número de plantas y mazorcas a la cosecha, humedad de grano y número de mazorcas podridas por parcela. Al grano le fueron medidas, en el laboratorio de Calidad de Granos y Semillas de la Fundación Danac, variables físicas tales como rendimiento de endospermo,

peso específico y peso de 100 granos.

Análisis estadísticos de datos agronómicos

Se realizaron análisis de varianza por ambiente para rendimiento de grano, así como para otras siete características de importancia agronómica. Los supuestos del análisis de varianza, normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas, se probaron previamente a realizar el análisis combinado a través de los tres ambientes.

Extracción de ADN

En invernadero, a partir de semillas de cada una de las líneas se obtuvieron plántulas, de las cuales se tomaron las muestras de tejido foliar fresco para realizar la extracción de ADN en el laboratorio de Biología Molecular del Postgrado de Fitopatología de la Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado. La extracción de ADN se realizó a partir del método modificado de extracción con CTAB al 2% (Doley and Doley, 1987).

Muestras de tejido foliar tierno fueron colocadas en microtubos identificados, para posteriormente macerar el tejido en N líquido como primera etapa de la extracción de ADN. La cantidad

de las muestras se diluyó a una concentración final de 10ng- μ l⁻¹.

Amplificación de ADN

Las amplificaciones en el caso de RAPD fueron realizadas con iniciadores de las series OPB, OPD, OPE y OPM, provenientes de Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, EEUU); pero en el estudio se utilizaron solamente los 20 de la serie OPD. Esto se debió a que con esta serie se lograron todas las reacciones de amplificación para las 14 líneas y las bandas mostraron una mejor resolución. Todas las reacciones de amplificación se realizaron con 25 μ g de ADN, de acuerdo a Williams *et al.* (1990). Las amplificaciones se realizaron por duplicado en un termociclador Perkin Elmer 480. La desnaturalización de ADN se realizó a 94°C por 5min, seguida por 45 ciclos de amplificación (94°C, 1min; 35°C, 1min; 72°C, 2min) y una extensión final a 72°C por 7min. Los productos de las amplificaciones se separaron por electroforesis sobre geles de agarosa al 1,5% (p/v) en buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV, para finalmente documentarlos mediante fotografías. En cada gel se colocó un marcador de peso molecular de 100pb.

Las reacciones de PCR para los SSR se realizaron en un volumen final de 15 μ l (1X de tampón para PCR, 2,5mM de MgCl₂, 150mM de cada dNTPs, 0,3mM de cada iniciador directo y reverso, 1U de Taq polimerasa y 50ng del ADN molde). Las amplificaciones de ADN se realizaron bajo las siguientes condiciones de temperatura: un ciclo inicial de desnaturalización por 2min a 94°C, seguido por 30 ciclos de amplificación comprendido por 94°C de desnaturalización por 30seg, alineamiento que depende de la temperatura de cada iniciador por 1min

TABLA I
 PROCEDENCIA DE LAS LÍNEAS QUE CONSTITUYEN EL MATERIAL EXPERIMENTAL

Líneas	Dureza grano	Nombre	Proyecto	Origen
1	Dentada	L25	4 Serie Danac	LaMaGuarabao79-3-#-#
2	Dentada	L20	4 Serie Danac	Tuxpeño Crema PB-5
3	Dentada	D07	3 Serie Danac	FPX-03B-FMHC1-07
4	Dentada	D25	3 Serie Danac	FPX-03B-FMHC1-25
5	Dentada	P21-104	Danac-CIMMYT	Pob, 21
6	Dentada	80802	Danac-CIMMYT	Cu88(HB-87)
7	Dentada	PC129	P,C, (Danac-USA)	L26 x Texa-105
8	Dura	L15	4 Serie Danac	Poza Rica 7929
9	Dura	F20	3 Serie Danac	FPX-01B-FMHC1-20
10	Dura	F04	3 Serie Danac	FPX-01B-FMHC1-04
11	Dura	40101-4	Reciclaje Danac	L15(Poza Rica 7929) x L13(Mez,Trop,Blan,-1-1)
12	Dura	L17	4 Serie Danac	Suwan x La Posta Blanco-6
13	Dura	F27	3 Serie Danac	FPX-01B-FMHC1-27
14	Dura	PC160	P,C, (Danac-USA)	L25 x Texa-1112w

TABLA II
LISTA DE INICIADORES SSR, DIRECTO Y REVERSO, CON INDICACIÓN DEL NOMBRE DEL MARCADOR, NÚMERO DE ALELOS, TEMPERATURA DE ALINEACIÓN Y CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA

Marcador	Cromosoma	Directo y Reverso (F +R)	PIC	Alelos	TA (°C)
phi056	1,01	ACTTGCTTGCTGCCGTTAC // CGCACACCACTTCCCAGAA	0,45	2	56
phi064	1,11	CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT // ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC	0,66	3	56
nc133	2,05	AATCAAACACACACCTTGCG // GCAAGGGAATAAGGTGACGA	0,47	3	54
phi053	3,05	CTGCCTCTCAGATTGAGAGATTGAC // AACCCAACGTACTCCGGCAG	0,34	2	56
phi073	3,05	GTGCGAGAGGCTTGACCA // AAGGGTTGAGGGCGAGGAA	0,49	2	56
phi076	4,11	TTCTTCCGCGGCTTCAATTTGACC // GCATCAGGACCCGCAGAGTC	0,61	3	60
phi109188	5,00	AAGCTCAGAAGCCGGAGC // GGTCATCAAGCTCTCTGATCG	0,50	2	54
phi087	5,06	GAGAGGAGGTGTTGTTTGACACAC // ACAACCGGACAAGTCAGCAGATTG	0,47	2	54
phi085	5,07	AGCAGAACGGCAAGGGCTACT // TTTGGCACACCACGACGA	0,62	4	60
umc1153	5,09	CAGCATCTATAGCTTGCTTGCATT // TGGGTTTTGTTTGTGTTTGTGTTG	0,50	2	54
phi070	6,07	GCTGAGCGATCAGTTCATCCAG // CCATGGCAGGGTCTCTCAAG	0,20	2	56
phi034	7,02	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT // GGGGAGCACGCCTTCGTTCT	0,44	2	56
phi116	7,06	GCATACGGCCATGGATGGGA // TCCCTGCCGGGACTCCTG	0,14	2	56
phi014	8,04	AGATGACCAGGGCCGTCAACGAC // CCAGTTCACCAGTCTGCTTTCGTG	0,46	2	52
phi015	8,09	GCAACGTACCTTCCCGA // ACGTGCATTCAATTACCGGGAAG	0,57	3	56
phi061	9,03	GACGTAAGCCTAGCTCTGCCAT// AAACAAGAACGGCGGTGCTGATTC	0,50	2	56
phi022	9,03	TGCGCACCAGCGACTGACC // GCGGGCGACGCTTCCAAAC	0,45	2	56
phi065	9,03	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG // CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC	0,59	3	54
umc1277	9,08	TTTGAGAACGGAAGCAAGTACTCC// ACCAACCAACCACTCCCTTTTATG	0,31	3	54
phi059	10,02	AAGCTAATTAAGCCGGTCATCCC // TCCGTGTACTCGGCGGACTC	0,49	2	60

Fuente: Warburton *et al.*, (2002) y Maize Genetics and Genomics Data Base (www.maizegdb.org/ssr.php)

y extensión por 1min a 72°C. Por último, un ciclo de extensión por 2min.

En la Tabla II se muestran los 46 iniciadores (23 directos y 23 reversos) utilizados. Todos ellos se distribuyeron uniformemente en los 10 cromosomas del maíz para amplificar sectores específicos del genoma que permitieran detectar polimorfismos genéticos. Estos iniciadores se seleccionaron a partir del trabajo de Warburton *et al.* (2002), donde inicialmente más de 87 SSR fueron considerados por el criterio de máxima cobertura del genoma y el número de bases de la secuencia repetida (≥ 3), y también por su consistencia y facilidad de automatización. En este trabajo solo se utilizaron los 23 pares de iniciadores SSR más discriminantes, procurando una distribución de al menos dos por cromosoma.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) 10% (p/v) en buffer TAE 1X a 100V durante 90min. Un marcador de peso molecular de 100bp

se usó para establecer el peso molecular de las diferentes bandas o alelos observados. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción en nitrato de plata al 0,02%.

Cálculo de distancias genéticas

Las bandas de ADN presentes en ambas repeticiones de cada muestra en el caso de los RAPD, fueron contadas como presencia (1) o ausencia (0) de productos amplificados. Las comparaciones de perfiles moleculares individuales fueron realizadas mediante la estimación de los coeficientes de similitud (GS) de Jaccard (1908):

$$GS = \frac{a}{(n-d)}$$

donde a: número positivo de coincidencias muestrales por presencia de amplificación, n: número total de tamaño de muestra, y d: número negativo de coincidencias muestrales por ausencia simultánea de amplificación.

La distancia genética fue estimada mediante la trans-

formación $GD = 1 - GS$. El dendrograma se construyó usando el método UPGMA y se realizaron los análisis de coordenadas principales (Grower, 1966). Se usaron las tres primeras coordenadas principales de acuerdo con el mayor porcentaje de variación explicado.

Para cada marcador SSR se estimó frecuencia alélica y se calculó el coeficiente de Nei (1972), que permitió estimar distancia genética mediante:

$$d_{ij} = -\ln \left[\frac{\sum_k |x_{ki} x_{kj}|}{\sqrt{\sum_k x_{ki}^2 x_{kj}^2}} \right]$$

donde d_{ij} : coeficiente de distancia entre el par de líneas i y j, x_{ki} : frecuencia del alelo k en la línea i, y x_{kj} : frecuencia del alelo k en la línea j.

El valor del contenido de información polimórfica (PIC) es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los *loci* microsatelitales. Existen varias ecuaciones que lo definen y en todas ellas su valor varía entre 0 y 1. En este estudio se

calcularon los PIC mediante la fórmula (Liu, 1998):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

donde p_i : frecuencia alélica del i-ésimo alelo, y N: número de alelos observados.

Todos los análisis se realizaron con los programas InfoGen, NTSYS-pc, Ver. 1,70 (Rohlf, 2000) y JMP 5,0,1,2 (SAS, 2003).

Resultados y Discusión

Evaluación y caracterización agronómica

Las líneas mostraron diferencias en cada uno de los ambientes evaluados (Tabla III), siendo la localidad de Sabana de Parra la de mejor rendimiento promedio de grano con 2154,70kg·ha⁻¹ (990,25-3407,70kg·ha⁻¹). La localidad de Las Guacamayas es la que más afecta el comportamiento de las líneas para esta característica, ya que mostró un valor promedio de 1688,70kg·ha⁻¹ (516,47-3156,70kg·ha⁻¹). En San Javier el comportamiento de las líneas fue estadísti-

camente similar a la localidad de Las Guacamayas.

Las diferencias de las medias del rendimiento entre las líneas para cada uno de los tres ambientes se presentan en el Tabla III. Un comportamiento diferencial por ambiente se observó, sin embargo, al hacer un ordenamiento de las líneas y tomar como referencia la localidad de San Javier, siendo que las líneas 7 y 1 son las más productivas para todos los ambientes y que, por el contrario, las líneas de menores rendimiento son la 13 y la 3 en San Javier, la 5 y 3 en Las Guacamayas, y la 10 y 5 en Sabana de Parra. La Figural muestra el biplot asociado a la interacción líneas por ambiente para el rendimiento del grano. Se confirma como la localidad de San Javier es favorable para la evaluación del rendimiento de las líneas

TABLA III
COMPARACIÓN DE MEDIAS (PRUEBA DE TUKEY)
PARA EL RENDIMIENTO EN GRANO (KG·HA⁻¹)
DE LAS LÍNEAS PARENTALES EN CADA UNO
DE LOS TRES AMBIENTES

Líneas	Ambientes		
	San Javier	Las Guacamayas	Sabana de Parra
7	4201,21a	3156,70a	2240,42abc
1	2670,48b	2977,43ab	3407,70a
6	2542,90b	1833,96abcd	1905,32abc
2	2303,21bc	1697,20abcd	3084,75ab
9	2083,04bcd	2434,80abc	2911,27ab
14	1990,45bcde	1638,57abcd	1271,81bc
4	1620,57cdef	1350,00cd	2760,76abc
8	1604,06cdef	1391,57cd	2504,81abc
11	1555,27def	1699,22abcd	2636,11abc
12	1311,87efg	1574,90bcd	1974,66abc
10	1291,73efg	1757,12abcd	990,25c
5	1254,89efg	516,47d	1251,63bc
3	1247,09fg	895,56d	1777,33abc
13	779,17g	1024,16cd	1448,94bc
Promedio	1889,80	1688,70	2154,70

Medias en las columnas no conectadas con la misma letra son significativamente diferentes (P≤0,05).

al ubicarse en el cuadrante +/+, en el punto (2.70, 1.56). Las localidades de Sabana de Parra y Las Guacamayas son contrastantes para esta característica y se ubican en los cuadrantes -/+ y +/-, en los puntos (-3.45, 0.73) y (0.75, -2.29), respectivamente. Las líneas 1, 2, 3, 4, 8, 11 y 9 tienen comportamiento favorable en la localidad de Sabana de Parra. Las líneas 5, 7, 6, y 14 se

adaptan mejor a las condiciones de San Javier. En la localidad de Las Guacamayas solamente las líneas 12, 13 y 10 mostraron un comportamiento favorable al comparar con las otras localidades.

Además de los efectos ambientales predominantes en cada localidad, las diferencias de comportamiento de las líneas entre los ambientes se pueden explicar por el hecho que todas fueron extraídas, evaluadas y multiplicadas en San Javier. Es por eso que, así como se evalúan los híbridos simples en diferentes ambientes por su estabilidad o el comportamiento particular en una zona, se debe evaluar también las líneas parentales de los híbridos en esos ambientes. Con una tal evaluación habría cierta garantía de estabilidad y comportamiento en los híbridos en función del comportamiento de las

líneas parentales en esos ambientes.

En el Tabla IV se muestra la comparación de las medias de las líneas mediante la prueba de Tukey para las características evaluadas a través de los ambientes. Al establecer un ordenamiento de las líneas en función del rendimiento, se evidencia que las líneas 7 y 1 son las de mejor comportamiento, y que las de peor comportamiento son las líneas 13 y 5. Hay una diferencia de 1 a 2 días entre la floración masculina (FM) y la femenina. Las líneas más precoces fueron la 1, 8, 11 y la 12 con valores entre 53 y 55 días a FM. El resto de las líneas alcanzaron los días FM entre los 57 y 58 días. Para altura de planta las líneas más altas fueron la 2, 4, y la 7 con valores de 181-190cm; mientras que las más bajas fueron las líneas 8, 10, 12 y 13. En general las líneas visualmente dentadas son más altas en comparación con las duras. La altura de inserción de la mazorca sigue el mismo comportamiento de la altura de planta, es decir las líneas duras tienen la inserción de la mazorca más baja en comparación con las dentadas. Las líneas con mayor altura de mazorca fueron la 2, 4 y 7, con valores entre 90 y 100cm, mientras que las de más baja inserción fueron las líneas 8, 10, 11, 12, 13 y 14 (54-65cm). Las líneas muestran bajos valores de acame de raíz y tallo; en ambos casos los valores más altos no superan el 10,25% en las líneas 4 y 12, respectivamente. En el porcentaje de mazorcas podridas varía entre valores de 21,36% en la línea 8 y 7,64% en la línea 9.

Evaluación y caracterización moliner

Las líneas resultaron diferentes para todas las características molineras evaluadas. La discriminación de las medias mediante la prueba de Tukey para ren-

TABLA IV
COMPARACIÓN DE MEDIAS (PRUEBA DE TUKEY) PARA EL RENDIMIENTO
DE GRANO Y SIETE CARACTERES DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA PARA CADA
LÍNEA PARENTAL EN EL ANÁLISIS COMBINADO A TRAVÉS DE AMBIENTES

Línea	Rend (kg·ha ⁻¹)	Caracteres						
		FM (días)	FF (días)	AP (cm)	AM (cm)	AR (%)	AT(%)	MP(%)
7	3199,4 a	58,2 a	59,0 a	190,3 a	100,3 a	7,64 ab	5,21 ab	12,09 abcd
1	3018,5 ab	55,4 bc	56,7 bc	170,5 bcd	81,6 bcd	6,81 ab	7,64 ab	16,01 abcd
9	2374,2 bc	57,1 a	58,2 ab	153,7 de	73,9 de	6,81 ab	4,44 ab	7,64 d
2	2361,7 bc	57,8 a	58,7 a	183,8 ab	89,6 abc	6,81 ab	8,49 ab	19,16 abc
6	2094,1 cd	55,1 bc	55,9 cd	162,8 cd	76,3 cde	5,21 ab	8,49 ab	15,00 abcd
11	1963,5 cd	53,9 cd	54,8 cd	155,3 de	65,5 efg	5,21 ab	6,00 ab	9,36 bcd
4	1910,4 cd	57,3 a	58,3 ab	181,3 abc	93,8 ab	10,25 a	7,64 ab	16,01 abcd
8	1833,5 cde	53,3 d	54,2 d	141,1 efg	59,3 fg	6,81ab	4,44 ab	21,36 a
14	1633,6 cdef	56,6 ab	57,9 ab	151,8 def	64,4 efg	6,00 ab	9,36 a	20,25 ab
12	1620,5 cdef	53,2 d	54,1 d	129,0 g	54,3 g	3,69 ab	10,25 a	17,04 abcd
10	1346,4 def	57,9 a	59,0 a	129,1 g	64,2 efg	4,44 ab	6,00 ab	9,36 cd
3	1306,7 def	57,5 a	58,4 ab	168,8 bcd	72,8 def	4,44 ab	3,69 b	15,00 abcd
13	1084,1 ef	57,8 a	58,8 a	133,0 fg	63,3 efg	4,44 ab	6,00 ab	11,16 abcd
5	1007,7 f	57,7 a	58,7 a	157,8 de	76,2 cde	2,96 b	6,00 ab	10,25 abcd

Rend: rendimiento de grano, FM: floración masculina, FF: floración femenina, AP: altura de planta, AM: altura de mazorca, AR: acame de raíz, AT: acame de tallo, MP: mazorcas podridas. Medias en las columnas no conectadas con la misma letra son significativamente diferentes (P≤0,05).

dimiento de endospermo, peso específico y peso de 100 granos es mostrada en la Tabla V. El ordenamiento de las líneas en función del rendimiento de endospermo indica que las líneas con mejor comportamiento son la 10, 11, 12 y 13, con valores por encima de 76,14% y con valores de peso específico $\geq 756,5\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$. Las líneas 4, 2, 7, 6 y 1, tuvieron rendimientos de endospermo $< 70\%$. Por lo general altos valores de rendimiento de endospermo se corresponden con altos valores de peso específico. Contrasta con este patrón el comportamiento de la línea 14, con 73% de endospermo y apenas $720,3\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$ de peso específico. La agroindustria requiere de materiales que superen el 70% de rendimiento de endospermo y los $750\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$ de peso específico; requerimientos mínimos de la materia prima para el proceso de molienda seca

TABLA V
COMPARACIÓN DE MEDIAS (PRUEBA DE TUKEY) DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL GRANO ENTRE LAS LÍNEAS PARENTALES EN EL ANÁLISIS COMBINADO

Líneas	Endospermo (%)	Peso específico (kg/hl)	Peso 100 granos (g)
10	77,07a	800,3a	17,2de
13	76,89a	805,0a	18,1cde
11	76,55ab	757,5b	15,2e
12	76,14abc	756,5b	23,6ab
8	74,16bcd	749,5bc	24,2ab
9	73,69cd	763,8b	25,5a
5	73,34d	745,0bc	27,0a
14	73,17d	720,3d	21,5bc
3	72,83d	763,3b	25,5a
4	69,70e	730,5cd	21,7bc
2	67,74ef	734,5cd	25,8a
7	67,45ef	747,8bc	26,9a
6	67,23ef	745,5bc	19,3cd
1	67,19f	746,0bc	24,8ab

Medias en las columnas no conectadas con la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

que permite obtener fracciones de los tamaños adecuados a las distintas aplicaciones de los productos de esta molienda (Robutti, 2004). Todas las líneas duras, identificadas con números del 8 al 14, además de las líneas 3 y 5, cumplen con este requisito. El criterio visual de dureza esta relacionado con mayor rendimiento de endospermo.

El peso de 100 granos esta relacionado con el tamaño, la densidad y la esfericidad del grano (Pomeranz *et al.*, 1985). Las líneas de mayor peso de 100 granos fueron 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 y 12, con valores entre 24 y 27g. Las líneas con menor peso de 100 granos fueron 11, 10, 13 y 6 con valores entre 15 y 19g.

Evaluación y caracterización molecular

Los 20 iniciadores RAPD utilizados amplificaron un total de 137 alelos. El número de fragmento por marcador estuvo en un intervalo de 5 a 18 alelos, con media de 9,78.

En el caso de los marcadores SSR, de los 23 pares de iniciadores utilizados solo tres fueron monomórficos ($\phi 093$, $\phi 032$ y $\phi 063$), por lo cual se utilizaron para la discriminación molecular a los 20 que sí mostraron diferencias alélicas. Los marcadores SSR polimórficos amplificaron un total de 48 alelos. El número de fragmentos por marcador

fue de 2-4 alelos, con media de 2,4 (Tabla II). Estos valores son bajos al compararlos con estudios realizados por Gethi *et al.* (2002), Warburton *et al.* (2002) y Liu *et al.* (2003), quienes trabajaron con mayor cantidad de líneas endocriadas de diferentes orígenes y mayor número de marcadores. Las causas de estos resultados pueden ser el tamaño de la muestra y la variabilidad de las líneas; además de la cantidad y poder discriminante de los marcadores utilizados. En el presente caso son 14 líneas originadas de diferentes poblaciones con un nivel S_3-S_4 de endocria provenientes del programa de mejoramiento de la Fundación Danac. Liu *et al.* (2003) utilizaron cientos de líneas templadas, subtropicales y tropicales que provienen de diferentes programas de mejoramiento cuyos genomas fueron explorados con 94 marcadores microsatélites. Warburton *et al.* (2002) trabajaron con 57 líneas endocriadas de origen diverso que fueron caracterizadas utilizando 85 marcadores SSR. Todo esto explica la mayor cantidad de alelos por locus reportados por los mencionados autores. La informa-

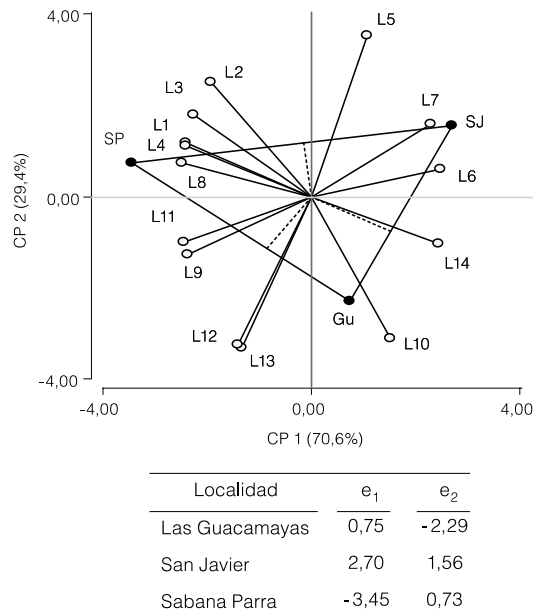


Figura 1. Biplot asociado a la interacción líneas por ambiente para el rendimiento del grano.

TABLA VI
RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROCRUSTES GENERALIZADO (APG) COMBINANDO INFORMACIÓN PROVENIENTE DE DATOS MORFOLÓGICOS, SSR Y RAPD EN 14 LÍNEAS DE MAÍZ

	Sumas de cuadrados dentro por caso			
	Consenso	Residual	Total	Prop Consenso
Línea 1	0,050	0,084	0,133	0,373
Línea 2	0,068	0,075	0,142	0,474
Línea 3	0,185	0,092	0,277	0,667
Línea 4	0,118	0,030	0,148	0,796
Línea 5	0,173	0,053	0,225	0,766
Línea 6	0,043	0,093	0,136	0,318
Línea 7	0,096	0,115	0,212	0,455
Línea 8	0,197	0,084	0,281	0,700
Línea 9	0,119	0,075	0,194	0,613
Línea 10	0,254	0,033	0,287	0,886
Línea 11	0,084	0,157	0,241	0,347
Línea 12	0,245	0,022	0,267	0,919
Línea 13	0,154	0,046	0,200	0,772
Línea 14	0,217	0,039	0,256	0,847
	Sumas de cuadrados dentro por grupo			
Morfológico	0,692	0,325	1,018	0,680
SSR	0,657	0,336	0,993	0,662
RAPD	0,653	0,337	0,990	0,660
Total	2,002	0,998	3,000	0,667

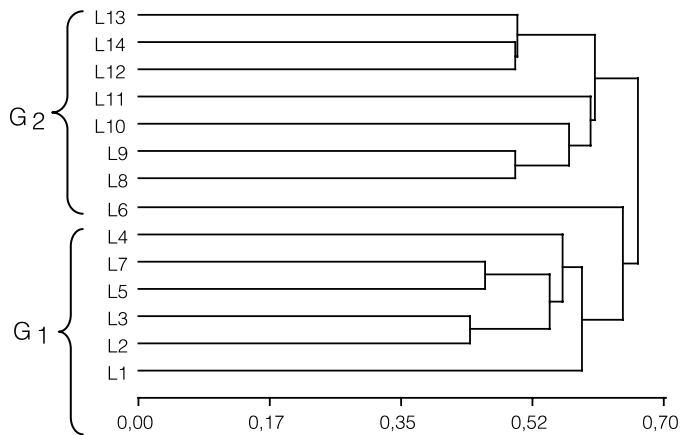


Figura 2. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de distancia (Jaccard (1-S)) con datos de marcadores RAPD en las 14 líneas de maíz.

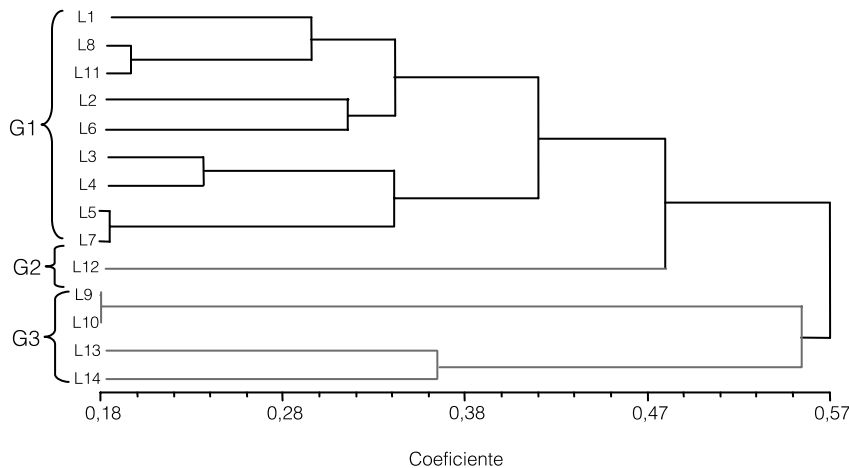


Figura 3. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA de los coeficientes de distancia genética de Nei con datos de marcadores SSR en las 14 líneas de maíz.

ción del contenido polimórfico (PIC) para los 20 SSR varió entre 0,14 y 0,66 con un valor promedio de 0,47.

Divergencia genética

En la Figura 2 se muestra el dendrograma construido

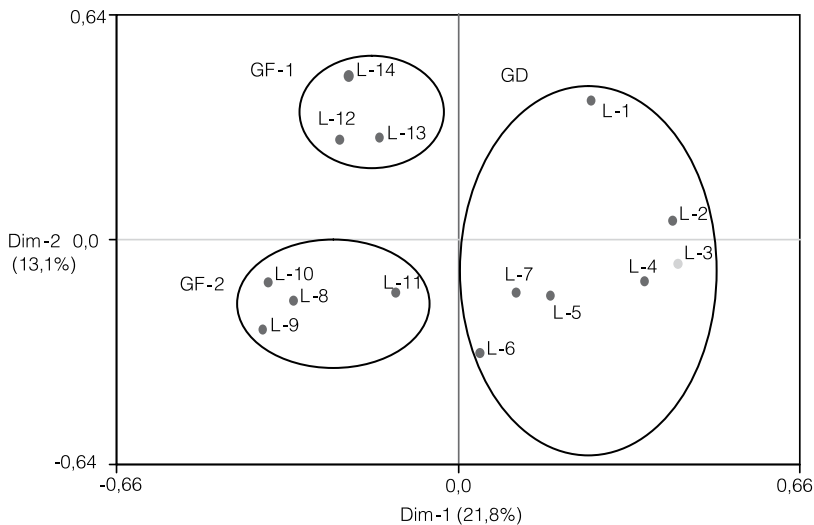


Figura 4. Representación gráfica del análisis de Coordenadas Principales con datos de marcadores RAPD de las 14 líneas de maíz mediante los coeficientes de Jaccard.

con los datos de marcadores RAPD a través del coeficiente de distancia Jaccard (1-S) y el algoritmo de UPGMA en las 14 líneas parentales. Esta clasificación muestra dos grupos claramente definidos, que separan las poblaciones de líneas en dentadas y duras; cada uno con varios subgrupos. El grupo G_1 incluye las líneas visualmente dentadas (6 y 1) y un subgrupo con líneas que tiene desde 0,58 hasta 0,48 de distancia (7, 4, 5, 3 y 2). Por otra parte está el grupo G_2 , que incluye las líneas duras, conformado por dos subgrupos, el $G_{2,1}$ con las líneas 8, 9, 10 y 11 y el $G_{2,2}$ formado por las líneas 12, 13 y 14.

El análisis de clasificación de las 14 líneas parentales con los datos de marcadores SSR se muestra mediante el dendrograma de la Figura 3. Esta representación permitió la formación de tres grupos bien definidos. El grupo G_1 , formado por las líneas 1, 8, 11, 2, 6, 3, 4, 5 y 7. Este grupo con la excepción de las líneas 8 y 11 que fueron clasificadas visualmente como duras, incluye a todas las dentadas. La línea 12 no agrupó con ninguna de las otras líneas y formó *per se* el grupo G_2 . El resto de las líneas (9, 10, 13 y 14), que fueron consideradas visualmente duras, se agruparon dentro del G_3 .

Al comparar los dos análisis, RAPD y SSR, se nota coincidencia en la clasificación. En ambos casos existe la tendencia de agrupar separadamente a las líneas dentadas y

duras, coincidiendo con la clasificación que en la práctica realizan los mejoradores. Nótese que las líneas 2 y 3 no fueron discriminadas por los RAPD y fueron separadas claramente con los SSR. Lo contrario sucedió con las líneas 9 y 10, que no fueron discriminadas con SSR. La clasificación basada en marcadores de tipo RAPD fue menos discriminante y esto se corresponde con lo ya discutido por muchos autores (Pejic *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 2002; Picca *et al.*, 2005). Este tipo de marcador es de herencia dominante y no permite diferenciar los alelos dominantes de los heterocigotos. Por otra parte, no se distribuyen uniformemente en todo el genoma y amplifica regiones aleatorias.

El análisis con los marcadores SSR mostró menores coeficientes de distancia entre las líneas al comparar el nivel de 0,18 contra 0,45 obtenido con RAPD. En concordancia con lo dicho se formó un nuevo grupo y algunas líneas se reacomodaron dentro de los grupos. Así se tiene que las líneas 8 y 11 son incluidas junto con las líneas dentadas. Las líneas duras 9 y 10 muestran un alto nivel de similitud para las regiones del genoma explorado con los iniciadores utilizados. De igual manera ocurre con las líneas dentadas 5 y 7.

En la Figura 4 se presenta una representación gráfica del análisis de coordenadas principales de los datos de marcadores RAPD. Este análisis de ordenación coincide con el de clasificación ya presentado. Las dos coordenadas formadas permiten ubicar espacialmente los grupos de líneas que presentan menor distancia entre ellas. La coordenada 1 (CoP-1) separa las líneas visualmente dentadas de las duras y la combinación de las dos coordenadas permite evidenciar tres grupos bien definidos: Un primer grupo *flint* (GF-1) formado

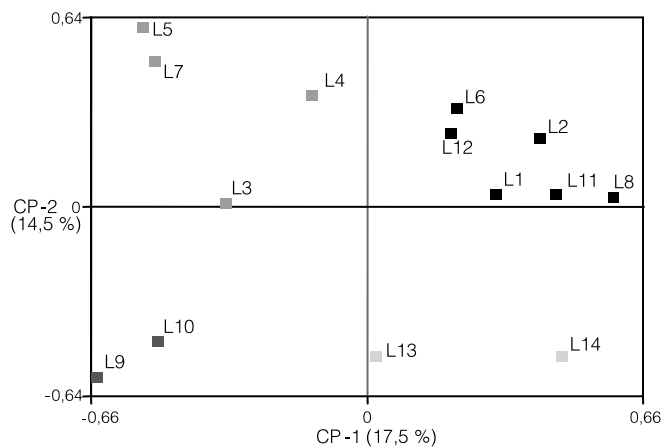


Figura 5. Representación gráfica del análisis de Componentes Principales con datos de marcadores SSR de las 14 líneas de maíz mediante los coeficientes de Nei.

por las líneas 12, 13 y 14; un segundo grupo *flint* (GF-2) formado por las líneas 8, 9, 10 y 11; y el grupo dentado (GD) formado por las líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Las líneas 1 y 6, consideradas como dentadas, son las que más se diferencian entre sí y del resto de las líneas de grupo.

Una representación gráfica del análisis de componentes principales (CP) para los datos de marcadores SSR se muestra en la Figura 5. Este análisis permite apreciar los grupos ordenados en el espacio mediante los componentes CP-1 y CP-2, los cuales explican 17,5 y 14,5% de la variación total, respectivamente. El componente CP-2 separó, de manera general, a las líneas dentadas de las duras, con la excepción de las líneas 8, 11 y 12. De la combinación de los dos componentes se aprecian cuatro grupos ubicados en los distintos cuadrantes. En el cuadrante +/+ están las líneas 1, 2, 6, 8, 11 y 12; en el cuadrante -/+ se ubican las líneas 3, 4, 5 y 7; las líneas 13 y 14 se ubicaron en el cuadrante +/- y

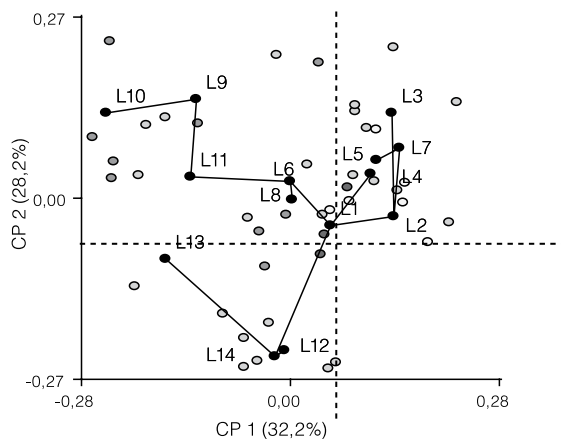


Figura 6. Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado (APG) desde la matriz de datos morfológicos, RAPD y SSR en 14 líneas de maíz.

las líneas 9 y 10 en el cuadrante -/-. Al comparar los dos análisis de ordenación realizados con los datos de RAPD y SSR se aprecia que las líneas 3, 4, 5 y 7 se mantienen en un mismo grupo en ambos casos. Las líneas 13 y 14 muestran mayor similitud entre ellas que con las demás. De la misma forma, las líneas 9 y 10 muestran similitud y se mantienen juntas en un mismo cuadrante. A diferencia del análisis con datos de RAPD, las líneas 1, 2 y 6 están ubicadas en el mismo cuadrante con las líneas 8, 11 y 12. Cada grupo de líneas ubicado en los distintos cuadrantes muestran similitudes y, por lo tanto, comparten muchos de los genes de los sitios

del genoma que fueron explorados con los iniciadores utilizados. Toda esta discriminación basada en los datos moleculares confirma la información del pedigrí de las líneas. En tal sentido, la similitud de las líneas 9 y 10 se debe a que provienen de la misma población FPX-01B-FMHC1; las líneas 8 y 11 tienen en común la población Poza Rica 7929 y las líneas 3 y 4 fueron extraídas de la población FPX-03B-FMHC1. En la Figura 6 se muestra la configuración de consenso del análisis de pro-

crustes generalizado (APG) desde la matriz de datos morfológicos, RAPD y SSR. Este análisis explica en sus dos primeras componentes más del 60% de variación observada y confirma la separación de las líneas en duras y dentadas por la componente CP-1. En la Tabla VI se muestran los resultados del APG y se confirma la posición de las líneas dentro de los grupos en los distintos análisis de ordenación. Se observan

valores de proporción en relación al consenso por encima del 0,61 con la excepción de las líneas 1, 2, 6, 7 y 11. La suma de cuadrados por grupos de datos fue similar y al relacionarlos con el consenso se observan valores de proporción de 0,680; 0,662 y 0,660 para los morfológicos, SSR y RAPD, respectivamente.

Conclusiones

1. Las líneas mostraron un comportamiento diferencial por ambiente, sin embargo las líneas 7 y 1 son las de mayor rendimiento de grano para todos los ambientes y por el contrario las líneas de menor rendimiento son la 13 y 3, en San Javier; la 5 y 3, en Las Guacamayas y la 10 y 5, en Sabana de Parra.

2. Las líneas con mayores rendimientos de endospermo fueron 10, 11, 12 y 13, con valores >76,14% y además superaron los 756,5kg·hl⁻¹ de peso específico. Por lo general altos valores de rendimiento de endospermo se corresponden con altos valores de peso específico. Todas las líneas duras además de las líneas 3 y 5 superen el 70% de rendimiento de endospermo y los 750 kg·hl⁻¹ de peso específico requerido por la agroindustria. El criterio visual de dureza se relacionó con mayor rendimiento de endospermo.

La evaluación de la divergencia genética entre las líneas mediante marcadores RAPD permitió clasificarlas en dos grupos claramente definidos, las dentadas y las duras, cada uno con varios subgrupos. Al utilizar marcadores SSR se formaron tres grupos bien definidos.

Al comparar los análisis de distancia genética, tanto con marcadores RAPD o SSR hubo coincidencia en la clasificación y ordenación de las líneas. En ambos casos la respuesta fue agrupar en dentadas y duras, lo cual coincide con la clasificación que en la práctica realizan los mejoradores. Sin embargo, la clasificación basada en marcadores RAPD fue menos discriminante que la realizada con marcadores SSR. La discriminación basada en los datos moleculares confirmó la información del pedigrí de las líneas.

REFERENCIAS

- Bernardo R (2001) Breeding potential of intra and interheterotic group crosses in maize. *Crop. Sci.* 41: 68-71.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Fedeagro (2009) Estadísticas Agrícolas. www.fedeagro.org/produccion/rubros.asp
- Gethi J, Labate J, Lakey K, Smith M, Kresovich S (2002) SSR

- variation in import US maize inbred lines. *Crop. Sci.* 42: 951-957.
- Grower J (1966) Some distant properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Nat.* 44: 223-270.
- Jain A, Bhatia S, Banga S, Prakash S, Lakshmikumar M (1994) Potential use of the random amplified polymorphic DNA technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.* 88: 116-122.
- Lanza L, de Souza C, Ottoboni L, Vieira M (1997) Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 1023-1030.
- Liu K, Goodmand M, Muse S, Smith S, Buckler E, Doebley J (2003) Genetics structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics* 165: 2117-2128.
- Liu B (1998) Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press. Nueva York, EEUU. pp 62-63.
- Nei M (1972) Genetics distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Perera J, Tormo A, García J (2002) *Ingeniería Genética, Preparación, Análisis, Manipulación y Clonaje de ADN*. Editorial Síntesis. España. 527 pp.
- Picca A, Helguera M, Salomón N, Carrera A (2005) Marcadores moleculares. En Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L (Eds.) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. INTA. Argentina. pp 61-68.
- Pomeranz Y, Czuchajowska C, Martin C, Lai F (1985) Determination of corn hardness by the stentvert hardness tester. *Cereal Chem.* 62: 108-112.
- Robutti J (2004) Calidad y usos del maíz. *IDIA XXI* 6: 100-104.
- Rohlf F (2000) *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Ver. 1.70. Exeter Software. Setanket, NY, EEUU.
- San Vicente F, Cabrera S, Gracia P (2004) *Situación del cultivo del maíz en Venezuela*. XX Reunión Latinoamericana de Maíz. Lima, Perú. pp 89-101.
- Santos J, Nienhuis J, Skroch P, Tivang J, Slocum M (1994) Comparison of RFLP genetic markers in determinig genetic similarity among *Brassica oleracea* L, genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87: 909-915.
- SAS (2003) *JMP 5.0.1.2. The Statistical Discovery Software*. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU.
- Thormann C, Ferreira M, Camargo L, Tivang J, Osborn T (1994) Comparison of RFLP and RAPD markers to estimate genetic relationship within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88: 973-980.
- Warburton M, Xia X, Crossa J, Franco J, Melchinger A, Frisch M, Bohn M, Hoisington D (2002) Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Sci.* 42: 1832-1840.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. *Nucl. Ac. Res* 18: 7213-7218.
- Williams J, Kubelik, A, Livak K, Rafalki J Tingey S (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.* 18: 6531-6535.
- Xia X, Reif J, Hoisington D, Melchinger A, Frisch M, Warburton M (2004) Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers. I. Lowland tropical maize. *Crop Sci.* 44: 2230-2237.