



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**EFFECTO SOBRE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE
SOJA (*Glycine max* L. Merr.) SOMETIDAS A UN PROTOCOLO
DE EXTRACCIÓN DE ADN**

LUISINA MONASTEROLO

TRABAJO FINAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Especialista en Producción de Semillas de Cereales, Oleaginosas y Forrajeras

DIRECTOR: DR. HUGO PERMINGEAT

CO- DIRECTORA: DRA. NIDIA MONTECHIARINI

2019

EFFECTO SOBRE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.) SOMETIDAS A UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Luisina Monasterolo

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario

Este trabajo final es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Especialista en Producción de Semillas de Cereales, Oleaginosas y Forrajeras, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentado para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en los laboratorios de Fisiología Vegetal y de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias en Zavalla, provincia de Santa Fe, durante el período comprendido entre agosto de 2017 y agosto de 2018, bajo la dirección del Dr. Hugo Permingeat y la Dra. Nidia Montechiarini.

Luisina Monasterolo

Dr. Hugo Permingeat

Dra. Nidia Montechiarini

Defendida:

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a la Comisión Académica de la Especialización que desde el primer día confió en mí y me permitió formar parte de la cohorte 2017, y a mis directores Hugo y Nidia, que me acompañaron en todo momento para que esto sea posible.

Agradezco enormemente a mis amores, Danilo y Barack, por serme incondicionales y acompañarme en cada emprendimiento que me propongo.

También les agradezco a mis padres, Alicia y Alberto, que siempre están ahí empujándome, incentivándome y ayudándome en todo lo que esté a su alcance.

Gracias a mis hermanos, Darío y Hernán, que siempre me animan y acompañan para alcanzar mis sueños.

Agradezco a mis amigas Nidia y Andrea que desinteresadamente y con toda su paciencia me brindaron su capacidad, tiempo y conocimiento científico para poder desarrollar los experimentos de la tesis.

Gracias a mis Pipeteros del alma, que en ningún momento dudaron de mí y siempre me empujaron hacia adelante con risas, abrazos y compartiendo conmigo años maravillosos.

A mis compañeros de BH que me brindaron su tiempo y siempre estuvieron ahí alentando e incentivando con energías para seguir.

A todos los que me acompañan o acompañaron en algún momento, gracias por estar!

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi abuela Rosa, quién todo el tiempo me insistió para que siga estudiando y creciendo profesionalmente, no tengo dudas que desde el cielo está súper orgullosa y feliz de que haya concluido esta etapa.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

L. Monasterolo; A. Martinatto; N. Montechiarini; C. Gosparini y H. Permingeat. Extracción de tejido seminal para análisis moleculares en soja: impacto sobre la calidad fisiológica de semillas. Congreso Mercosoja. Bolsa de Comercio de Rosario, 2019.

Monasterolo, Luisina; Montechiarini, Nidia; Gosparini, Carlos; Permingeat, Hugo. Efecto sobre la calidad fisiológica de semillas de soja sometidas a un protocolo de extracción de ADN. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2018.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

BrEt: Bromuro de Etidio

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DDT: Días después del tratamiento

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

QTL: locus de un carácter cuantitativo

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

SNP: Variaciones de nucleótidos simples

SSR: Secuencias simples repetidas

VNTR: número variable de repeticiones en tándem

RESUMEN

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es la principal oleaginosa cultivada en el mundo, con un gran interés nutricional debido a su alto contenido de proteína y aceite, razón por la cual se difundió ampliamente, siendo actualmente Estados Unidos, Brasil y Argentina los principales productores a nivel mundial. Es una especie autógena y de escasa variabilidad genética debido principalmente a la estrecha base de cultivares utilizados como parentales en los programas de mejoramiento. Desde el comienzo del mejoramiento vegetal se utilizaron los marcadores morfológicos para el proceso de selección (por ejemplo, el color de flor y la forma de hoja), los cuales consisten en características fenotípicas de sencilla identificación visual. Sin embargo, una limitante importante en el uso de estos marcadores fenotípicos radica en su escasa disponibilidad, normalmente asociada a que se trata de genes de herencia monogénica y predecible según las leyes de Mendel. Adicionalmente, muchas veces la visualización del carácter se debe realizar en estadio de planta adulta, lo que prolonga los tiempos de evaluación, aumenta la necesidad de mano de obra e incrementa considerablemente el espacio necesario para conducir los programas de mejoramiento. Otro aspecto de relevancia, es el efecto del ambiente, que puede dificultar la clara visualización y confirmación de caracteres morfológicos, quedando muchos de éstos ligados a la subjetividad, capacidad y entrenamiento del observador. A partir de la década del 80, el advenimiento de las tecnologías de marcadores moleculares permitió agilizar y optimizar el progreso genético obtenido a través de la selección. Este tipo de marcadores se detectan directamente a nivel del ADN y puede corresponder a secuencias tanto codificantes como no codificantes. El gran avance y desarrollo de estas tecnologías, sumado a la capacidad de análisis, exactitud, reproducibilidad y costo accesible de los marcadores moleculares, derivó en su rápida adopción e implementación en el mejoramiento vegetal en general e incluso para la verificación e identificación de variedades de soja. Por otra parte, etapas cruciales en el mejoramiento de soja requieren de la evaluación sistematizada de individuos únicos con el objetivo de identificar aquellos que continuarán en el proceso de selección y mejoramiento. Esto implica el minucioso cuidado de los mismos durante todo su ciclo de vida, a fin de mantener la estricta trazabilidad genotípica de los individuos de interés, la cual es normalmente evaluada a partir del tejido foliar. En este sentido, la posibilidad de realizar análisis moleculares a partir del propio tejido seminal optimizaría el proceso de mejoramiento, permitiendo no sólo un mejor seguimiento de los individuos, sino, además, aumentar la

eficiencia del proceso en general al identificar y seleccionar tempranamente aquellos individuos de real interés. Esto requiere de manera excluyente, garantizar la calidad de cada uno de estos individuos únicos e irremplazables que aseguren su posterior siembra y desarrollo de manera exitosa. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto sobre la calidad fisiológica de semillas de soja sometidas a un protocolo de extracción de ADN para análisis moleculares basados en PCR.

El tratamiento de las semillas consistió en la realización de una perforación de un milímetro de diámetro en la zona de los cotiledones lejana a la zona de inserción con el eje embrionario. Semillas del mismo cultivar que no fueron sometidas al tratamiento fueron utilizadas como control. El tejido extraído de cada semilla se sometió a un protocolo de extracción de ADN para determinar si es apto para ser utilizado en técnicas de marcadores moleculares basadas en PCR. La calidad fisiológica de las semillas se evaluó al inicio del tratamiento y a los 30, 60, 90 y 180 días después del tratamiento, a través de las pruebas de Poder Germinativo y Energía Germinativa, prueba de Vigor por Envejecimiento Acelerado, prueba de Conductibilidad Eléctrica y Prueba de Viabilidad y Vigor por Tetrazolio.

La cantidad y calidad de ADN extraído resultaron adecuadas para su utilización en análisis moleculares basados en PCR. Los análisis de calidad fisiológica mostraron que el tratamiento de extracción de tejido no afectó notoriamente la calidad de las semillas, con valores similares de viabilidad y germinación y un deterioro progresivo levemente mayor en el tiempo para las semillas tratadas respecto al control. Estos resultados avalarían, por lo tanto, la implementación de un protocolo de extracción de ADN para análisis moleculares basados en PCR a partir de extractos de tejidos de semillas sin afectar la calidad de las mismas para su uso como simiente.

Palabras claves: Soja, Tejido seminal, Calidad fisiológica, Extracción de ADN.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) is the most important oilseed plant in the world, having a high nutritional value due to its protein and oil content, which has determined its wide adoption worldwide, with the United States, Brazil and Argentina being the most important producers. It is a self-pollinated species with low genetic variability, as a consequence of the narrow genetic bases used in most breeding programs. Morphological markers have been used since the dawn of plant breeding (for example, the color of flowers or the shape of leaves), which consist of phenotypic characteristics that are easily detected by visual inspection. Nonetheless, an important limitation in the application of these types of markers is their low availability, usually associated with the fact that they come from genes of monogenic inheritance as described by the laws of Mendel. Additionally, many times the visualization of the phenotype has to be done at the adult stage of the plant, which extends the evaluation times, increases the labor needs and requires larger spaces to conduct a breeding program. Another relevant fact is the effect of the environment on these types of markers, which can interfere with their visualization, giving room to mistakes, depending on the subjectivity and skill of the breeder. Since the '80s, the development and implementation of molecular markers allowed breeders to increase the genetic progress obtained through selection. These types of markers are detected at the DNA level and may correspond to coding or non-coding sequences. The rapid development of these technologies, together with their accuracy, high reproducibility and affordability, determined their current high adoption in breeding programs as well as their use in varietal identification. On the other hand, some of the crucial steps in soybean breeding require the systematic evaluation of unique individuals, with the objective of identifying those who will continue in the breeding and selection process. This implies a careful manipulation of individuals throughout their life-cycle, to guaranty the genotypic traceability, which is normally evaluated from leaf tissue. Therefore, the availability of a method to use molecular markers directly from seed tissue could optimize the breeding processes, allowing improving the follow-up of individuals, increasing the efficiency in general by early identification and selection of high-value individuals. This requires the need to guarantee the survival and adequate development of individual seeds subject to analysis. To this end, the objective of the current work was to determine the effect on the physiological quality of seeds subjected to a tissue sampling protocol that is both adequate for DNA extraction and molecular analysis.

Treated seeds were subjected to a 1-millimeter perforation on the cotyledon, away from the embryonic axis insertion point. Untreated seeds of the same cultivar were used as controls. The tissue sampled was used for DNA extraction in order to determine its suitability for PCR based molecular marker analysis. The physiological quality of the seeds was evaluated at 0, 30, 60, 90 and 180 days post-treatment, through the following tests: Germination Test, Germination Energy, Accelerated Ageing, Electrical Conductivity and Tetrazolium Test.

We determined that the quantity and quality of the DNA extracted was adequate for PCR based molecular marker analysis. The physiological quality analysis showed that the tissue sampling did not affect significantly the quality of the seeds, with similar values of viability and germination between treated and control seeds, and a slightly higher deterioration with time for treated seeds. These results, therefore, endorse the implementation of a seed sampling and DNA extraction protocol that does not affect significantly the quality of seeds.

Keywords: Soybean, Seed tissue, Physiological quality, DNA extraction.

ÍNDICE

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
Historia de la soja y su expansión.....	1
Incorporación del cultivo y su importancia en la economía de Argentina.....	1
Generalidades de la planta y la semilla de soja.....	3
Calidad fisiológica de la semilla de soja.....	4
Mejoramiento genético de soja.....	5
- Mejoramiento convencional.....	5
- Mejoramiento de soja asistido por técnicas moleculares.....	7
OBJETIVOS.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Material Vegetal y tratamiento de las semillas.....	13
Sitio Experimental.....	14
Extracción de ADN y análisis moleculares.....	15
Análisis de calidad de semillas.....	16
- Prueba de Germinación.....	16
- Prueba de Vigor por Envejecimiento Acelerado.....	17
- Prueba de Conductividad Eléctrica de semillas Individuales.....	18
- Prueba de Viabilidad y Vigor por Tetrazolio.....	19
Análisis Estadísticos.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Contenido de humedad de las semillas.....	21
Análisis moleculares de amplificación de ADN por PCR.....	21
Análisis de calidad de semillas.....	23

- Viabilidad.....	23
- Poder Germinativo.....	24
- Vigor.....	27
Germinación y establecimiento de las plantas a campo.....	30
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO 1 - Análisis Estadísticos para Viabilidad y Poder Germinativo.....	37
ANEXO 2 - Análisis Estadísticos para Vigor.....	39

EFFECTO SOBRE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.) SOMETIDAS A UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN

Historia de la soja y su expansión

La soja (*Glycine max* L. Merr) es nativa del este asiático, específicamente del norte y centro de China, donde desde el año 3000 AC ya era considerada como una de las cinco semillas sagradas junto con el arroz, el trigo, la cebada y el mijo. En la India se la promocionó a partir de 1735, en tanto, las primeras semillas plantadas en Europa provenían de China y su siembra se realizó en el Jardín des Plantes de París recién en 1740. Años más tarde, en 1765, se introdujo en América (Georgia, EE.UU.) desde China, vía Londres. Pocos años después de la guerra chino-japonesa (1894-1895), los japoneses comenzaron a importar tortas de aceite de soja para usarlas como fertilizantes. Aunque en EEUU su incorporación fue temprana, su producción no tuvo relevancia hasta la década del 40 donde se produjo la gran expansión del cultivo, alcanzando el liderazgo de la producción mundial a partir de 1954 hasta la actualidad. En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó en la década del 40, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja. Caso similar sucedió en Argentina, donde la incorporación del cultivo data de 1862, aunque no fue hasta la década del 60 donde comenzó a expandirse su producción (Ridner, 2006).

En la actualidad, los países que lideran la producción mundial son EEUU, Brasil y Argentina, produciendo más del 80% de grano de soja. En un segundo grupo de productores se encuentran China, Paraguay, India y Canadá, aunque es interesante señalar que entre todos estos países, junto con el resto de los países que cultivan soja en el mundo, no alcanzan la producción de Argentina (Ybran y Lacelli, 2016).

Incorporación del cultivo y su importancia en la economía de Argentina

En el país se realizaron distintos intentos para arraigar el cultivo de soja tanto a través de la actividad oficial como privada, siendo el ámbito privado el que jugó un papel fundamental en la implantación definitiva del cultivo en sus inicios. Las primeras plantaciones en el país se hicieron en 1862, aunque no fue exitosa su incorporación en el sistema

agropecuario en ese momento debido a la alta dehiscencia (apertura espontánea de las vainas liberando las semillas al medio ambiente) que presentaban los cultivares que se disponían en el país (Piquín, 1968; Zeni, 1971). En 1956, la empresa privada Brandt Laboratorios SA fundó una filial llamada Agrosoja SRL, la cual realizó un convenio de investigación agrícola con la Dirección General de Investigaciones Agrícolas (dependiente del Ministerio de Agricultura de la Nación, organismo precursor del INTA), y a partir de ese trabajo conjunto se introdujeron al sistema agrícola variedades de buen comportamiento con respecto a su dehiscencia, lo cual consistió en un aporte fundamental en la constitución de la base genética de soja de nuestro país. En la década del 60, gracias al esfuerzo de unos pocos investigadores, se logró su implantación definitiva y se incrementó en los años 70, hasta convertir a la Argentina en el tercer productor mundial de grano, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja (Giancola, 1998).

La producción de soja y sus derivados es actualmente una de las actividades más importantes de la economía Argentina. La producción de esta oleaginosa se expandió considerablemente con el transcurso del tiempo, pasando de 3,7 millones de toneladas en 1980, a 11 millones en 1996/97, a 47,5 millones en 2006/2007 (Teubal, 2008) y a 56 millones de toneladas en la campaña 2015/16 (Bolsa de Cereales, 2019). Actualmente, en la campaña 2018/19, la producción nacional del cultivo se encuentra 56,5 millones de toneladas (Bolsa de Comercio de Rosario, 2019).

El incremento de producción a partir de la incorporación del cultivo se atribuye en sus inicios al aumento de la superficie sembrada, que en la actualidad representa el 55% de las casi 37 millones de hectáreas productivas que se siembran en el país (Ybran y Lacelli, 2016). Cabe destacar que si bien el auge de la producción de soja en una primera instancia se manifestó debido al aumento de la superficie, coexistieron otros factores que aportaron significativamente al rendimiento, como es la incorporación de equipamiento de alto desarrollo tecnológico, los nuevos métodos de siembra y cosecha, el avance en el mejoramiento genético de los materiales sembrados en el país, como también la aparición de semillas transgénicas con su respectivo paquete tecnológico. En paralelo a los aumentos de rendimiento, año a año se ha incrementado la capacidad de procesamiento del grano, tanto a través de inversiones para aumentar la capacidad de molienda, mejora en los procesos industriales, como también se incorporaron nuevas tecnologías en los puertos para su exportación, lo cual genera un incremento del valor agregado en la economía del país.

El cultivo de soja reviste un valor singular para nuestra economía, ya que la soja es uno de los productos que provee mayores ingresos de divisas, siendo más del 90% de su producción exportada (Strada y Vila, 2015). Tras la devaluación de 2002 y el alza de los precios internacionales de la soja y de otras commodities se produjo un aumento continuo del valor total de las exportaciones de éstos ítems. En 2008, se exportó aceite de soja por 4275 millones de dólares, harina y pellets por 5762 millones y grano de soja por 3428 millones; todos estos productos sumaron en total 13602 millones de dólares representando el 24,4% del valor total de las exportaciones de la Argentina. El valor de las exportaciones de soja en 2007 aumentó con relación a 2006 en un 52,3%; este aumento se debió no sólo a mayores volúmenes exportados sino fundamentalmente al alza significativo de sus precios (Teubal, 2008).

La importancia de dicho cultivo no se limita únicamente al sector económico, sino que también se considera la principal oleaginosa cultivada en el mundo debido a que produce un grano de gran interés nutricional, con alto contenido de proteína y aceite. En algunas variedades mejoradas se observa alrededor del 40-42% de contenido de proteína y del 20-22% de aceite, respecto a su peso seco. Dentro de las proteínas que contiene el cultivo de soja existe un buen balance de aminoácidos esenciales, destacando lisina y leucina. Tal como planteó en sus orígenes la cultura nipona "El que tiene soja, posee carne, leche y huevo", en referencia directa a las múltiples propiedades de la oleaginosa (Ridner, 2006).

Generalidades de la planta y la semilla de soja

La soja es una planta anual perteneciente a la familia de las Fabáceas ex Leguminosas, presenta flores perfectas, con órganos femeninos y masculinos envueltos dentro de la corola de color blanquecino o púrpura según la variedad, y de acuerdo a su hábito reproductivo se la clasifica como autógama. Su fruto es una vaina dehiscente y su longitud varía entre dos y siete centímetros, cada fruto puede contener de una a cuatro semillas. La semilla generalmente es esférica y de color amarillo, presenta una cicatriz llamada hilo que se genera en el lugar donde se encontraba unida la semilla a la vaina, y el color del mismo varía desde amarillo a negro. El tamaño de la semilla es mediano, pudiendo presentar un peso de 100 semillas desde 5 a 40 gramos, aunque en las variedades comerciales oscila entre 10 y 20 gramos las 100 semillas (<https://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>).

En la semilla podemos diferenciar al embrión, constituido por un eje embrionario y dos cotiledones, envuelto por una cubierta seminal o tegumento (Figura 1). En el eje embrionario pueden diferenciarse tres partes: en el extremo apical la plúmula, en el extremo distal la radícula, ambos unidos por el epicótilo e hipocótilo. Unidos al eje, se encuentran los cotiledones, los cuales constituyen los principales órganos de reserva y están conformados por células alargadas llenas de “cuerpos proteicos” esféricos y numerosos “esferosomas” de aceite (Ridner, 2006). El tegumento, de procedencia exclusivamente materna, se origina a partir de los tejidos del óvulo, la primina y la secundina, dando lugar, respectivamente, al tegumento externo (testa) e interno (tegma).

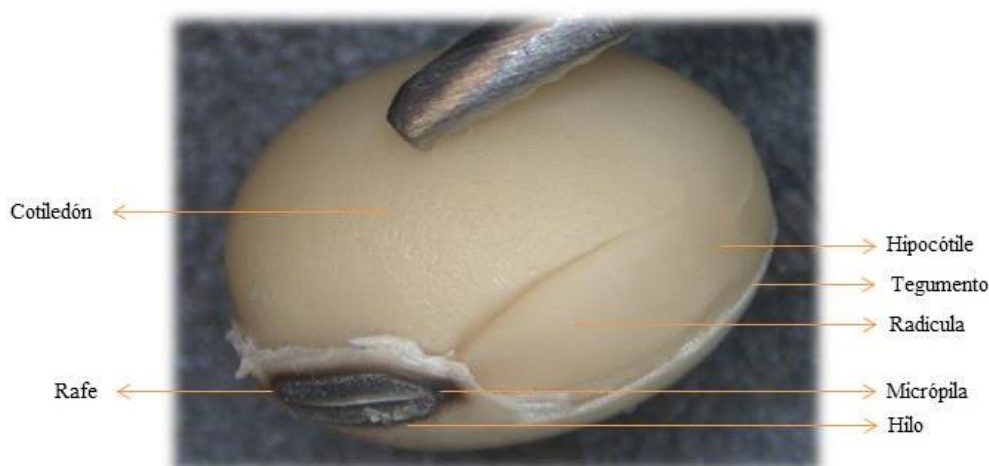


Figura 1: Morfología de la semilla de soja

Durante la formación de la semilla, una vez fecundado el óvulo, se puede diferenciar un desarrollo inicial muy lento, el cual luego se acelera hasta que el contenido de humedad alcanza ~ 90%. Luego, el porcentaje de humedad comienza a disminuir hasta el 50-55%, momento en el cual se alcanza la madurez fisiológica, definida como el momento en que el embrión se independiza del abastecimiento materno y la semilla alcanza su máximo peso seco (Casini y Bragachini, 2005). A partir de la madurez fisiológica, la semilla inicia un período de rápida deshidratación hasta alcanzar a la cosecha valores de humedad cercanos al 14%.

Calidad fisiológica de la semilla de soja

La calidad fisiológica de las semillas de soja decae naturalmente más rápido que en otras especies cultivadas, presentando una pérdida gradual de viabilidad luego de seis meses

de almacenamiento (Fabrizius et al., 1999; El-Abady et al., 2012). Adicionalmente, se ha establecido que el máximo valor de calidad fisiológica de las semillas se determina en el período comprendido entre la entre madurez fisiológica y la cosecha (Zanakis et al., 1994; Ellis, 2019). Por lo tanto, las condiciones ambientales a las cuales se encuentran sometidas estas semillas desde madurez fisiológica en adelante, así como las condiciones de manejo del cultivo y las buenas prácticas de conservación de las semillas luego de la cosecha son sumamente importantes para mantener la calidad fisiológica de las mismas (Casini y Bragachini, 2005). Existen varios factores que influyen en la conservación de la calidad fisiológica de la semilla de soja. Guardar las semillas secas, sanas y limpias es clave para su almacenamiento, dado que permite mantener adecuadamente sus sistemas propios de autodefensa. Cuando se guardan semillas sucias, ya sea con tierra, impurezas, etc., se favorece el ataque de hongos, bacterias, insectos y ácaros (Casini y Bragachini, 2005). Otro factor de consideración es la respiración, proceso a través del cual se consume oxígeno y se libera CO₂ y calor. Elevados contenidos de humedad de semillas, altas temperaturas, o contaminación con insectos u hongos aumentan este proceso. Esto genera que las semillas consuman sus sustancias de reserva y comiencen a sufrir pérdidas de peso y de calidad fisiológica. De igual manera, toda semilla dañada, rota o alterada en su constitución física es propensa a un mayor riesgo de deterioro.

Mejoramiento genético de soja

- Mejoramiento convencional

Por muchos años el objetivo principal del mejoramiento tradicional de soja fue el desarrollo de variedades resistentes a enfermedades, el incremento del rendimiento en peso de los granos, como así también el aumento en contenido de aceite y proteína (Johnson y Bernard, 1962).

Según Fehr (1987), el desarrollo de cultivares de soja a través del mejoramiento tradicional puede resumirse en cuatro pasos generales:

1. La fuente de variabilidad genética es desarrollada mediante poblaciones segregantes a través de hibridación artificial de padres seleccionados.

2. Se avanza hacia las generaciones sucesivas mediante autofecundación natural, obteniendo así las líneas puras. Durante este proceso de obtención de líneas se realiza la selección de los caracteres deseados.
3. Las líneas puras seleccionadas son evaluadas por rendimiento y/o por los caracteres de interés agronómico deseados en múltiples ensayos en distintas localidades y años.
4. Las semillas de las líneas puras que presentan características superiores son incrementadas y publicadas en el mercado como el nuevo cultivar para producción comercial.

Estos mismos pasos generales se aplican en numerosos métodos de mejoramiento en diferentes cultivos. Los cuatro principales métodos utilizados en el cultivo de soja son, el de descendiente único, el genealógico, el masal y el de testeo en generaciones tempranas, siendo el primero el más elegido, ya que permite obtener variedades de forma rápida y en pocos años debido a que se puede conducir en invernadero, y son posibles de 2 a 3 generaciones por año (Fehr, 1987). En todos los casos, el objetivo final, independientemente del método, se basa en la identificación de genotipos superiores, modificando las frecuencias alélicas de los individuos a través de la selección.

Por consiguiente, el nivel de éxito del proceso de selección dependerá de varias cuestiones, entre ellas, del número de genes involucrados en el control genético del carácter de selección, lo que determina si el mismo es de herencia monogénica (determinado por un solo gen) o poligénica (varios genes implicados en la expresión del carácter). Adicionalmente, aún en la forma más sencilla de herencia monogénica, la naturaleza (recesiva o de dominancia) de los genes condicionará el programa de mejoramiento de acuerdo a las dosis alélicas necesarias para la visualización del carácter de selección. También dependerá de las interacciones interalélicas, ya que la respuesta variará si éstas son de dominancia (el gen se expresa dependiendo de su alelo) o de aditividad (cuando el gen se expresa independientemente de su alelo). Por último, otro factor que influye de manera significativa en la selección es el ambiente, el cual afectará en mayor o menor medida el proceso de selección dependiendo de la heredabilidad (proporción de la expresión fenotípica atribuible a efectos genéticos) asociada al carácter de interés bajo estudio (Levitus et al., 2010).

Desde el comienzo del mejoramiento vegetal, los marcadores morfológicos fueron utilizados en el proceso de selección, por tratarse de características fenotípicas de sencilla

identificación visual. Por muchos años y hasta la actualidad, este tipo de marcadores fueron importantes descriptores para la inscripción de nuevas variedades. Las principales limitantes en el uso de este tipo de marcadores radican en su bajo nivel de polimorfismo (variantes alélicas de un mismo gen) y en que generalmente los caracteres para los cuales pueden usarse estos marcadores morfológicos son de herencia dominante y en muy pocos casos poligénica.

Estas condicionantes principales, sumado a la estrecha base de variabilidad genética presente en los cultivares de soja disponibles en el país, determinan que pocos descriptores morfológicos resulten como herramientas de selección confiables para los programas de mejoramiento de la especie. Por mencionar algunos, los de uso más frecuente por su sencilla identificación son el color de la flor y la forma de la hoja. Otros de expresión fenotípica más compleja y para los cuales se requiere mayor entrenamiento en la observación resultan el color de pubescencia de las plantas y el color de hilo de las semillas. Esto constituye por lo tanto una limitante importante al progreso en la obtención de nuevos y mejores cultivares de soja en base a una caracterización exclusivamente fenotípica.

- **Mejoramiento de soja asistido por técnicas moleculares**

Otros tipos de marcadores además de los morfológicos o fenotípicos previamente citados son los marcadores bioquímicos, los marcadores moleculares y los funcionales o de expresión. Los marcadores isoenzimáticos forman parte de los marcadores bioquímicos y corresponden a diferentes proteínas que llevan a cabo un mismo rol enzimático y que, por lo tanto, son diferenciables a partir de los patrones de migración electroforética característicos resultantes para cada uno de ellos (Levitus et al., 2010). Estos fueron utilizados principalmente en la década del 80 para acelerar la introgresión de caracteres monogénicos desde un germoplasma exótico hacia uno cultivado.

Los marcadores moleculares son definidos como segmentos de ADN que pueden corresponder a secuencias tanto codificantes como no codificantes, con ubicación física en un cromosoma identificable y de herencia predecible según las leyes de Mendel. Para su aplicación al mejoramiento vegetal es necesario, además, que los mismos presenten polimorfismo que posibiliten la discriminación entre individuos de una población segregante o entre individuos híbridos y autofecundos provenientes de cruzamientos dirigidos entre parentales seleccionados. Los principales usos y ventajas de los marcadores moleculares son (Levitus et al., 2010; www.isaaa.org):

- ✓ Evaluar, organizar, mantener e incrementar la diversidad genética y la caracterización del germoplasma.
- ✓ Disminuir la interacción genotipo/ambiente, pudiendo seleccionar a través del genotipo en vez de hacerlo por fenotipo, proceso que hoy conocemos como “Selección asistida por marcadores moleculares”. Mediante esta técnica se pueden reducir los tiempos requeridos para completar los ciclos de selección, no teniendo que esperar a la planta adulta para su caracterización, y por ende permite acortar un ciclo de mejoramiento de seis o siete generaciones a sólo tres.
- ✓ Estimar las distancias genéticas entre poblaciones, líneas y materiales de cruzamientos.
- ✓ Detectar los loci de rasgos monogénicos y cuantitativos (QTL, “*quantitative trait loci*”).
- ✓ Identificar las secuencias de genes candidatos útiles.
- ✓ Realizar la identificación o huella digital (“fingerprints”) de los genotipos.

Dentro del grupo de los marcadores moleculares existen numerosas técnicas, las cuales se clasifican según las distintas metodologías utilizadas:

- ✓ Basados en restricción del ADN e hibridación, como es el caso de los polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Botstein et al., 1980) y las repeticiones en tándem de número variable (VNTR, Rogstad, 1996).
- ✓ Basados en amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de secuencias al azar, tal el caso de los marcadores de polimorfismo por la amplificación al azar del ADN (RAPD, Williams et al., 1990; Welsh y McClelland, 1990); o de fragmentos específicos, como ocurre en las secuencias simples repetidas o también conocidos como microsatélites (SSR, Ben-Ari y Lavi, 2012).
- ✓ Restricción del ADN y amplificación por PCR, donde se ubican los polimorfismos en el largo de los fragmentos de amplificación (AFLP, Vos et al., 1995).
- ✓ Identificación de variaciones de nucleótidos simples o polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, Rafalski, 2002).

En la Tabla 1 se presentan las características generales de los principales marcadores moleculares utilizados en el mejoramiento vegetal, mostrando ventajas y desventajas en cuanto a la aplicabilidad de cada uno de ellos, de acuerdo a los objetivos de cada proyecto y disponibilidad de recursos.

Tabla 1: Principales características de los marcadores moleculares más utilizados en el mejoramiento vegetal (adaptado de Ben-Ari y Lavi, 2012; Korzun, 2003).

Marcador de DNA	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Técnica de laboratorio	Hibridación de ADN (Southern blot); gel de agarosa	PCR; gel de agarosa	PCR, gel de acrilamida	PCR, gel de acrilamida	PCR, Extensión de cebadores; chips
Número de loci detectados	Locus simple	Multiloci	Multiloci	Locus simple	Locus simple
Origen del polimorfismo	Mutación puntual (en un sitio de restricción)	Mutación puntual (alterando la hibridación del cebador)	Mutación puntual (principalmente en un sitio de restricción)	Variaciones en el número de repeticiones	Mutación puntual (con información de la secuencia)
Nivel de polimorfismo	Bajo	Bajo	Bajo (para cada banda), pero una reacción detecta varios loci	Muy alto	Bajo para cada locus
Dominancia	Co-dominante	Dominante	Dominante	Co-dominante	Co-dominante
Abundancia	Mediana	Baja	Mediana	Mediana	Muy alta
ADN de calidad	Alto	Alto	Moderado	Moderado	Alto
Facilidad de uso	Difícil	Fácil	Fácil	Fácil	Fácil
Facilidad de automatización	Baja	Moderada	Moderada	Alta	Alta
Reproducibilidad	Alta	No confiable	Alta	Alta	Alta
Costos de desarrollo	Bajos	Bajos	Moderados	Altos	Altos
Costo por análisis	Alto	Bajo	Moderado	Bajo	Bajo

Los marcadores RFLP fueron implementados en la mayoría de los grupos de investigación en mejoramiento de cultivos desde el inicio del uso de estas tecnologías, mientras que los AFLPs y SSRs son actualmente las técnicas más elegidas debido a la mejor facilidad de detección y automatización. Al mismo tiempo, la adopción de marcadores SNPs también se amplió debido a la creciente información disponible y de uso complementario, como es el caso de la alta disponibilidad de secuencias y el conocimiento de la función de los genes (www.isaaa.org). Recientemente, el Instituto Nacional de Semillas (INASE) incorporó

oficialmente a los SNPs como herramienta de identificación de variedades con la finalidad de garantizar la pureza genética e identidad varietal de soja en el país (INASE, 2018).

En paralelo a la incorporación de los marcadores moleculares, desde 1983 se inició el desarrollo de protocolos para transformar plantas de interés agronómico conocidos como cultivos transgénicos (Herrera-Estrella et al., 1983), apareciendo de este modo los OGM (Organismos Genéticamente Modificados). Los OGMs son producto de la extraordinaria Revolución Científica y Tecnológica de finales del siglo XX (García y Paredes, 2012) y desde la última década también se suman los cultivos editados (Alfonso Lozano, 2019). El método de detección de individuos modificados (por transgénesis o edición) es un punto clave del programa de mejoramiento, donde uno de los más utilizados, por su sencillez y bajo costo, es la amplificación del ADN por PCR (Ahmed, 2002; Kuiper, 1999). Tanto en el caso de las plantas transgénicas como editadas, se utilizan cebadores que detecten las secuencias específicas del transgen o del gen modificado en el genoma de la planta (Gómez et al., 2003).

En particular, el desarrollo e incorporación de estas biotecnologías a la asistencia en los programas de mejoramiento vegetal permitió incrementar ampliamente la base genética disponible en soja, proponiendo a los marcadores moleculares como nuevas y variadas herramientas de diferenciación y selección. Las mismas ofrecen enormes ventajas respecto a los marcadores morfológicos del mejoramiento convencional. Asimismo, el mejoramiento asistido por marcadores moleculares aún requiere del exitoso establecimiento y desarrollo de todos los individuos bajo estudio, los cuales serán sometidos al proceso de selección por análisis moleculares a partir de una muestra de tejido vegetal individual, normalmente foliar. La posibilidad de llevar a cabo estos análisis en etapas previas, a partir del tejido seminal individual, podría por lo tanto agilizar y optimizar aún más el proceso. De esta manera, aquellos individuos que no presenten el carácter deseado podrán ser tempranamente descartados y sólo se requerirá la siembra, establecimiento y posterior seguimiento y cuidado de los individuos que resultaran de interés. En resumen, esto se traduciría en una reducción de tiempo, espacio, mano de obra y costos del programa de mejoramiento. No obstante, esta posibilidad podrá ser explotada en tanto la porción de tejido extraído necesaria para el análisis molecular no afecte sustancialmente la calidad seminal. Por tal motivo deberá tenerse en cuenta, tanto la alta susceptibilidad a la pérdida de calidad previamente descrita en soja, como la condición de cada una de estas semillas como individuos únicos e irrepetibles de una

población segregante, provenientes de un cruzamiento dirigido de parentales seleccionados o la descendencia de individuos transgénicos o editados.

El presente trabajo de investigación propone, por lo tanto, evaluar el efecto sobre la calidad fisiológica de semillas individuales de soja sometidas a un protocolo de extracción de ADN que resulte en cantidad y calidad suficiente para estudios moleculares basados en PCR, al mismo tiempo que permita la adecuada germinación, y posterior establecimiento y desarrollo de plantas como parte de un programa de mejoramiento genético de la especie.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la factibilidad de implementación de un protocolo para análisis moleculares basados en PCR a partir de ADN extraído de tejido seminal como una estrategia superadora en la asistencia por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento de soja.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar la aptitud, en cantidad y calidad, del ADN extraído a partir del tejido seminal para análisis moleculares basados en PCR.
- 2- Establecer si el tratamiento de extracción de tejido seminal *per se* afecta la calidad fisiológica de las semillas de soja.
- 3- Evaluar el efecto sobre la calidad fisiológica de las semillas de soja durante el almacenamiento de las mismas luego del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y tratamiento de las semillas

Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max* L. Merr.) obtenidas en la campaña 2016/17. El cultivar utilizado fue DM 4915 IPRO STS®. Durante su almacenamiento, desde la cosecha hasta el inicio del tratamiento (~ 4 meses), las semillas se mantuvieron en el laboratorio envasadas al vacío con un 12,7% de humedad inicial y conservadas a temperatura ambiente en ambiente fresco y seco.

El tratamiento de las semillas consistió en la realización de una perforación de un milímetro de diámetro de lado a lado de la semilla (~ 7 mg de tejido) en la zona de los cotiledones, lejana a la zona de inserción con el eje embrionario (Fig. 2A). La ubicación estratégica de perforación tuvo por objetivo evitar el daño en el eje embrionario de las semillas, siendo éste el principal órgano involucrado en la germinación de las mismas. Semillas del mismo cultivar que no fueron sometidas al tratamiento fueron utilizadas como control (Fig. 2B). Se utilizó para la perforación un mini torno eléctrico (Black and Decker) con una mecha de 1 mm de diámetro (Fig. 3A-3B). Luego del tratamiento, las semillas Tratadas (T) y Control (C) se conservaron en recipientes plásticos herméticos en un ambiente fresco y seco.

A los 0, 30, 60, 90 y 180 días después del tratamiento (DDT), las semillas T y C se sometieron a los diferentes análisis de calidad fisiológica descriptos a continuación. Previo a cada evaluación de calidad fisiológica los recipientes plásticos fueron abiertos y se midió nuevamente la humedad de las respectivas semillas. Las determinaciones no destructivas se hicieron sobre la totalidad de semillas T a evaluar en cada tiempo (~750 semillas) y una muestra equivalente de semillas C, utilizando un medidor de humedad FARMPRO (Fig. 3C).



Figura 2. A- Semillas de soja cv. DM4915 IPRO STS sometidas a un tratamiento de extracción de tejido para análisis moleculares (T). B- Semillas de soja cv. DM4915 IPRO STS control sin tratamiento (C).

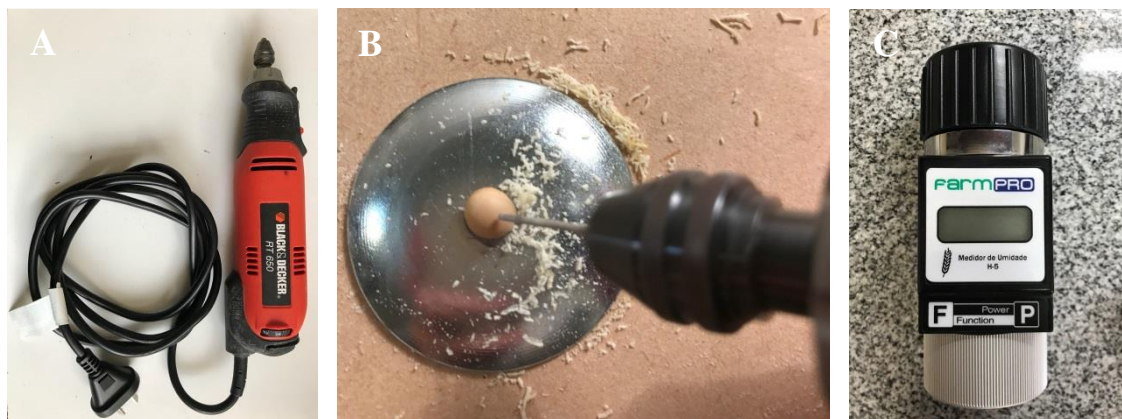


Figura 3 A- Minitorno eléctrico Black and Decker utilizado para la perforación. B- Metodología de perforación de la semilla para la extracción de tejido, y C- Medidor de humedad FARMPRO.

Sitio experimental

El tratamiento de perforación para extracción de tejido seminal y la posterior obtención de ADN genómico para análisis moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (-33,0285484; -60,8891785; Fig. 4). Los análisis de calidad fisiológica de las semillas T y C se desarrollaron en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (-33,0287886; -60,8890594; Fig. 4). La siembra a campo de las semillas T y C a los 90 DDT se realizó en la Sección Experimental de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (-33,0263263; -60,8883531; Fig. 4).

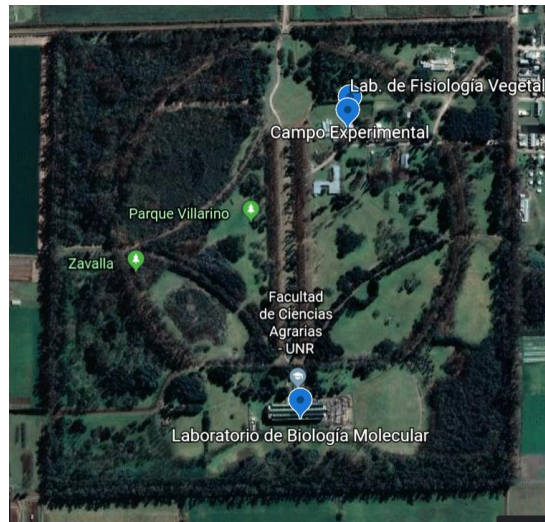


Figura 4. Vista aérea de los sitios experimentales ubicados en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR.

Extracción de ADN y análisis moleculares

La porción de tejido extraída a partir de cada una de las semillas correspondientes al T se colectó y se conservó individualmente en un tubo eppendorf en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento. Dicha metodología de extracción permitió obtener el tejido completamente molido para continuar con la extracción de ADN.

Como control positivo del experimento se utilizó tejido foliar de plantas de soja, el cual fue molido en N_2 líquido previo al protocolo de extracción de ADN.

Las muestras de tejido seminal y foliar se sometieron luego a un protocolo de extracción de ADN genómico con CTAB, propuesto por Lipp et al. (1999). Para los análisis moleculares se evaluó la presencia del gen β -*Tubulina* (Gene Bank: NM_001252709.2), el cual fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando cebadores directo (5'-TGCCAGTCCAACCTTTTCAT-3') y reverso (5'-CACTGAGCTATGGACCCAAGT-3') específicos para el gen bajo estudio. Las condiciones de PCR (30 ciclos) fueron: 30 s. a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la desnaturalización; 30 s. $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la hibridación, 20 s. a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la elongación. El gen β -*Tubulina* fue utilizado varias veces como gen de referencia en experimentos de PCR de soja y se encuentra confirmada su estabilidad (Wang et al., 2006). El producto amplificado, de 110 pb, se reveló en gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de Etidio $0.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Como control negativo se evaluó la amplificación en el medio de reacción conteniendo todos los elementos de PCR pero sin ADN genómico.

Análisis de calidad de semillas

La calidad fisiológica de las semillas T y C se evaluó a los 0, 30, 60, 90 y 180 DDT. Los métodos utilizados fueron: Energía Germinativa (EG) a través de la prueba de “Primer conteo”, prueba de Poder Germinativo (PG), prueba de Vigor por Envejecimiento Acelerado (EA), y prueba de Germinación y Vigor por Conductividad Eléctrica (CE) y prueba de Viabilidad y Vigor por Tetrazolio (Tz).

- Prueba de Germinación

Se empleó el método de siembra entre papeles (del inglés “Between paper”) según el manual de procedimientos ISTA (2019), sobre un total de 400 semillas divididas en ocho repeticiones de 50 semillas cada una. Las semillas se distribuyeron uniformemente sobre el papel (Wypall de 28 x 42 cm) previamente humedecido a saturación con agua destilada estéril (Fig. 5A). Luego, se procedió al armado de rollos, los cuales se cubrieron con bolsas de polietileno para evitar la desecación. Los rollos se incubaron en posición vertical en estufa de germinación, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y oscuridad (Fig. 5B). A los 5 días de incubación se procedió a la apertura de rollos para realizar un primer conteo del número de plántulas normales establecidas, el cual fue utilizado como un estimador del vigor determinado como EG. A los 8 días de incubación, se procedió al conteo final de plántulas normales establecidas para el cálculo del valor de PG correspondiente. La clasificación de plántulas se realizó según el criterio del Manual de Evaluación de Plántulas de ISTA (2019), como: plántulas normales (intactas y/o con defectos leves), plántulas anormales (dañadas, deformadas o podridas) y semillas no germinadas (duras y muertas).

Los resultados fueron expresaron como Porcentaje de Plántulas Normales.

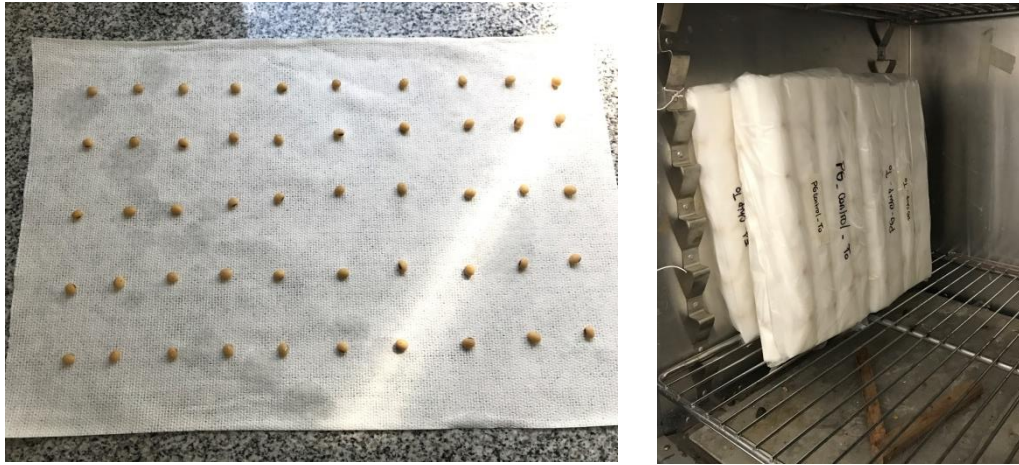


Figura 5 A- Distribución de las semillas sobre el papel de germinación **B-** Rollos confeccionados y dispuestos verticalmente en la estufa de germinación.

- Prueba de Vigor por Envejecimiento Acelerado

Doscientas semillas T y C se colocaron en respectivas mini cámaras de envejecimiento acelerado (CEREALTOOLS®). Se colocó 100 ml de agua destilada dentro de las cámaras y sobre la malla metálica se colocaron las semillas a fin de evitar el contacto directo de las mismas con el agua. Las mini cámaras se incubaron en estufa en condiciones de alta temperatura ($42 \pm 1^\circ\text{C}$), alta humedad relativa ($\sim 100\%$) y oscuridad por 48 horas (Fig. 6). Luego de esta incubación, las semillas fueron divididas en 4 réplicas de 50 semillas cada una, se distribuyeron uniformemente sobre papel Wypall y se confeccionaron los rollos de germinación correspondientes, siguiendo las indicaciones para la metodología explicada en el análisis de PG. La evaluación de las plántulas se realizó luego de ocho días de incubación de acuerdo a la metodología previamente descripta para la prueba de PG.

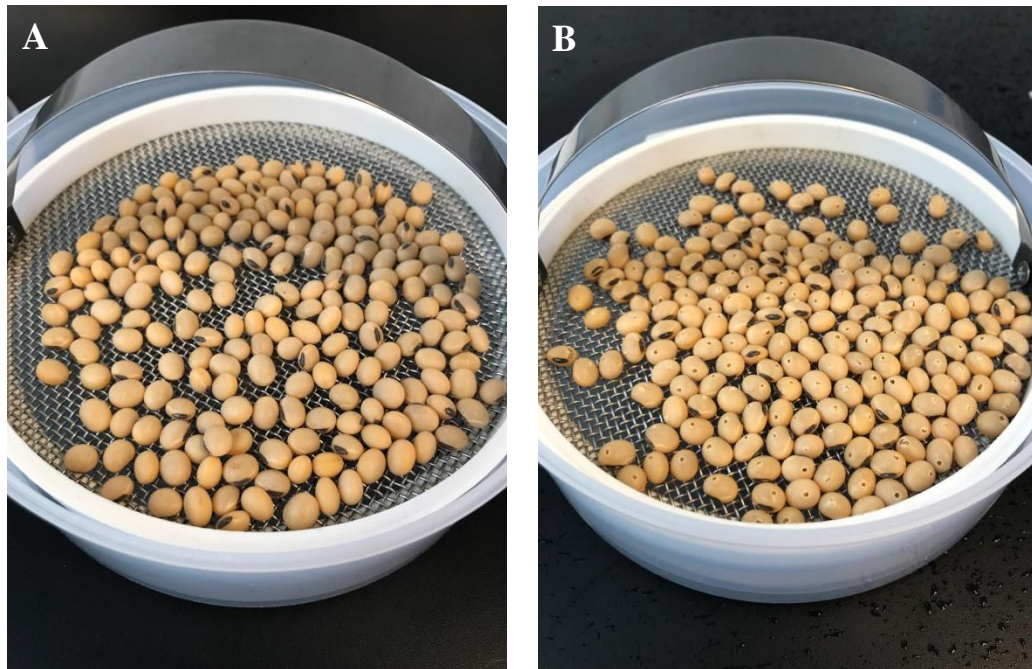


Figura 6. Semillas en las Mini cámaras CEREALTOOLS® luego de ser incubadas a $42\pm 1^\circ\text{C}$, con alta humedad relativa por 48 horas. **A-** Semilla control **B-** Semilla tratada.

- Prueba de Conductividad Eléctrica de semillas Individuales

Se evaluó la Conductividad Eléctrica Individual (CEI) de las semillas T y C con Analizador automático de semillas SAD 9000-S (MR Consultar Ingeniería e Informática, Rosario, Argentina). Este equipo arroja resultados de germinación, vigor y semillas duras a través de la correlación de valores de CEI promedio en $\mu\text{Siemens.cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, denominados valores de "partición" o de "corte". Estos valores de corte permiten clasificar a las semillas en vigorosas, no vigorosas con capacidad para germinar, no viables o como semillas duras con baja capacidad de imbibición. Los valores establecidos para la especie en estudio (soja) son: $< 10 \mu\text{Si.cm}^{-1}$ para semillas duras, de 10 a $180 \mu\text{Si.cm}^{-1}$ para la estimación de vigor, de 180 a $240 \mu\text{Si.cm}^{-1}$ para la estimación de germinación y $> 240 \mu\text{Si.cm}^{-1}$ para semillas no viables. El equipo consta de un cabezal múltiple de medición de 100 pares de electrodos (Fig. 7A), una interfase y un software de análisis que permite la medición de la conductividad producto del lixiviado de electrolitos para semillas individuales. Cien semillas T y C, respectivamente, se colocaron en las bandejas de medición en las 100 celdas individuales conteniendo 8 cc de agua deionizada (Fig. 7B). Las bandejas se incubaron a 23°C durante 24 h y posteriormente se realizó la medición de la CE en $\mu\text{Si.cm}^{-1}\cdot\text{semilla}^{-1}$ (Craviotto et al., 2009).



Figura 7 A- Dispositivo de medición de conductividad eléctrica conformado por 100 celdas y sus respectivos electrodos de medición. B- placa de celdas contenedoras de semillas individuales.

- Prueba de Viabilidad y Vigor por Tetrazolio

Se evaluaron 50 semillas por cada condición, T y C. Las semillas se sumergieron inicialmente en agua destilada y se incubaron durante 18 horas a 27 ± 1 °C. Luego, las semillas se sumergieron en solución acuosa de Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Tz) al 0,1 % y se incubaron en oscuridad a 27 ± 1 °C durante 3 horas (Fig. 8, Craviotto et al., 2008). Para la evaluación de las semillas individuales se retiró el tegumento de cada semilla, se observó la topografía, homogeneidad e intensidad de coloración, la turgencia de los tejidos, la localización y la profundidad de coloración en el interior de los órganos sexuales. Las semillas se clasificaron como: viables sin defectos (1), viables con defectos leves (2), viables con defectos moderados (3), viables con defectos severos (4) y no viables (5). El resultado se expresó para viabilidad como porcentaje de semillas viables totales, y para vigor como porcentaje de vigor alto (A: viables sin defectos y con defectos leves), medio (B: viables con defectos moderados), o bajo (C: viables con defectos severos).



Figura 8. Semillas control (izquierda) y tratadas (derecha) durante la incubación en solución acuosa de Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,1 %.

Análisis Estadísticos

Los resultados se analizaron mediante el programa estadístico INFOSTAT (2018 v.) con un nivel de significación de $P = 0,05$ (Anexo 1 y 2).

Para la variable respuesta PG, y Vigor, a través de EG y EA, se procedió a analizar los datos con el método no paramétrico Kruskal-Wallis.

En el caso de Viabilidad y Vigor analizados a través por la prueba topográfica de Tetrazolio y el porcentaje de PG y Vigor medido a través de CE, se utilizó el Test exacto de Fisher para variables categóricas no relacionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de humedad de las semillas

Los valores de humedad registrados al inicio del experimento y a los 30, 60, 90 y 180 DDT, tanto en las semillas T como C, se mantuvieron en un rango entre 10 y 12,5 % (Fig. 9). Dichos valores indicarían que las condiciones de almacenamiento fueron aceptables para el mantenimiento de la calidad fisiológica y están de acuerdo con el valor de humedad indicado para semillas de soja (13,5 %) por encima del cual la susceptibilidad al deterioro por factores bióticos y abióticos aumenta (Cassini y Bragachini, 2005).

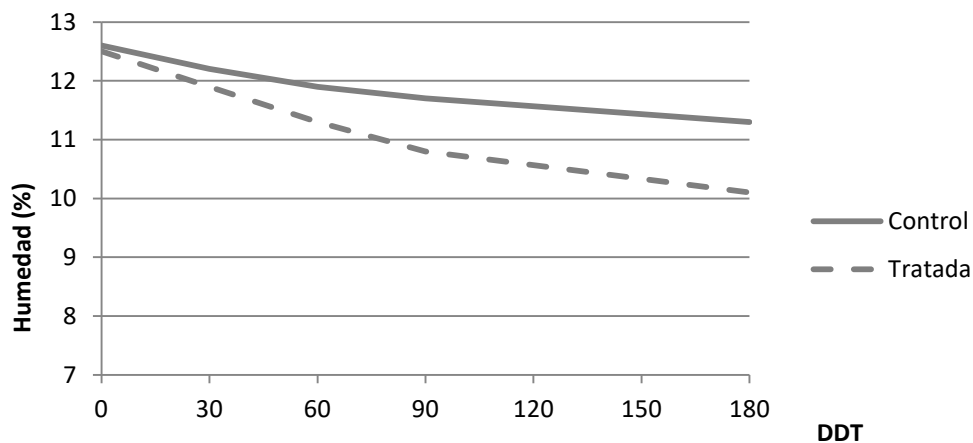


Figura 9: Valores de humedad de semillas de soja tratadas (T) y control (C) a los 0, 30, 60, 90 y 180 días después del tratamiento (DDT).

Análisis moleculares de amplificación de ADN por PCR

Los análisis de PCR generaron los amplicones esperados de 110 pb correspondientes al gen *β -tubulina* de soja a partir del ADN de la muestra extraída de todas las semillas individuales analizadas (Fig. 10, calles 2 a 16) y también del tejido foliar utilizado como control (Fig. 10, calle 17). En todos los casos, las bandas resueltas en los geles resultaron claramente visibles, nítidas y con intensidades de coloración similares, indicando que la amplificación de ADN a partir de tejido seminal fue tan posible como la normalmente desarrollada a partir de tejido foliar.

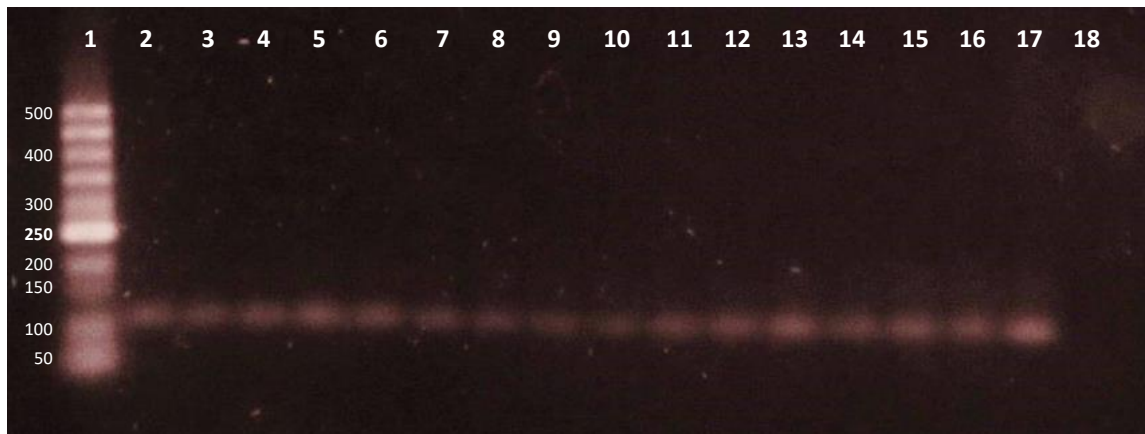


Figura 10. Gel agarosa 2%, teñido con BrEt 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Calles: **1-** Marcador de Peso Molecular (50 bp). **2 a 16-** Gen β -*Tubulina* amplificado a partir de ADN extraído de tejido seminal. **17-** Control de reacción (+): Gen β -*Tubulina* amplificado a partir de ADN extraído de tejido foliar. **18-** Control de reacción (-) sin ADN molde.

Estos resultados confirman que la pequeña fracción de tejido extraída de cada semilla fue adecuada para obtener ADN de calidad y en cantidad suficiente para realizar estudios moleculares por PCR. Así, esta técnica ofrece una gran ventaja para los programas de mejoramiento genético de soja, permitiendo realizar la identificación de caracteres deseados en la propia semilla y evitando la necesidad de siembra, obtención de plántulas y su respectivo cuidado hasta la extracción de tejido foliar para su posterior estudio. De esta manera, sólo los individuos de interés seleccionados en estas etapas tempranas continuarán bajo estudio, y el programa de mejora resultará más económico y eficiente.

El método de extracción de ADN utilizado en este trabajo (Lipp et al, 1999) es efectivo, eficiente, robusto en cuanto a calidad y cantidad de ADN aislado y económico, pero al mismo tiempo es laborioso y demandante de tiempo. Hoy existen kits comerciales de extracción de ADN que fácilmente pueden reemplazar este método de extracción con resultados equivalentes y con una demanda de tiempo mucho menor. En relación al gen elegido para la amplificación en este trabajo (β -*tubulina*), éste es un gen ubicuo en el genoma de las plantas y se utilizó al solo efecto de mostrar la utilidad de la técnica. La aplicación de esta técnica en un programa de mejoramiento requerirá ajustar las condiciones de PCR para el marcador molecular buscado, el (trans)gen o gen editado que se desea evaluar.

Análisis de calidad de semillas

- Viabilidad

Los resultados de Viabilidad medidos por la prueba de Tetrazolio para las semillas T y C al inicio del experimento y luego de 30, 60, 90 y 180 DDT se muestran en la Fig. 11. Tanto para las semillas T como las C, la viabilidad disminuyó durante el tiempo de almacenamiento. Dicho comportamiento ya fue descrito previamente en soja, la cual presenta una pérdida de calidad natural rápida característica de la especie (Fabrizius et al., 1999; El-Abady et al., 2012). Sin embargo, para todos los tiempos evaluados, los valores de viabilidad (Tabla 2) descendieron leve y paulatinamente; en mayor medida aunque no significativamente en las semillas T respecto a las semillas C.

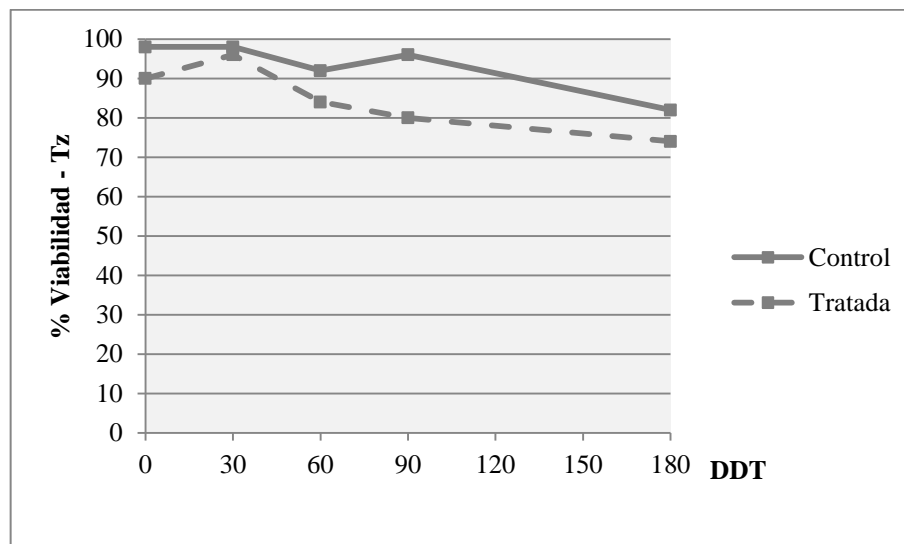


Figura 11: Viabilidad (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) evaluada por la prueba de Tetrazolio (Tz).

Estos resultados indicaron que las condiciones de almacenamiento de las semillas fueron adecuadas para mantener la alta calidad inicial durante el almacenamiento, aún en las semillas T. Si bien el tratamiento de perforación en las semillas tuvo un efecto negativo sobre las mismas en comparación con las semillas C, éste no condicionó de manera excluyente su posterior uso como simiente.

Tabla 2. Valores promedio de Viabilidad medidos por PG, Tz y CE. Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

DDT	Tratamiento	% viabilidad por Tz	% PG	% PG por CEI
0	C	98	90	95
	T	90	86	12*
30	C	98	89	91
	T	96	66*	3*
60	C	92	94	86
	T	84	88*	0*
90	C	96	92	88
	T	80	84*	3*
180	C	82	85	-
	T	74	82	-

- Poder Germinativo

Los valores de PG medidos para semillas T y C mostraron nuevamente una tendencia decreciente leve con el tiempo de almacenamiento (Fig 12), confirmando la buena conservación de las mismas, tal como se indicó previamente en los resultados de viabilidad. Similarmente a lo ocurrido en los análisis de viabilidad, las semillas T presentaron siempre valores de PG inferiores a los de las semillas C (Tabla 2). Estas diferencias fueron significativas a los 30, 60 y 90 DDT. Sin embargo, los datos muestran claramente la pérdida progresiva natural de la calidad de las semillas de soja durante el almacenamiento aún para las semillas C, independientemente del tratamiento.

Estos resultados permiten concluir que, análogamente a lo observado en los análisis de viabilidad, el tratamiento de perforación de las semillas tampoco afectó severamente la capacidad de las mismas para germinar y dar plántulas normales.

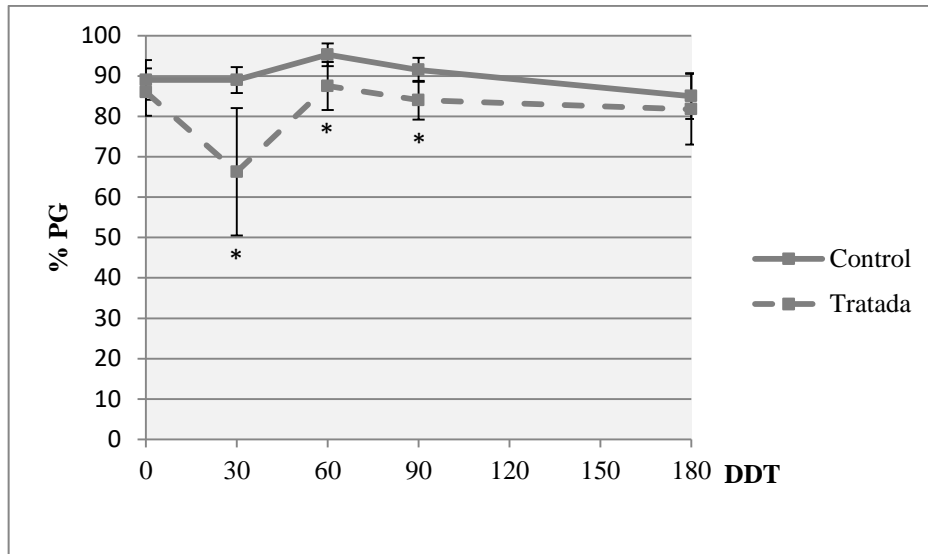


Figura 12: Poder Germinativo (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) evaluada por la prueba de Poder Germinativo (PG). Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

Por otro lado, la estimación del PG a través de la prueba de Conductividad Eléctrica (CE) arrojó resultados completamente diferentes (Tabla 2), presentando valores que se correlacionaron con una baja a nula capacidad germinativa de las semillas T para todos los DDT evaluados (Fig. 13). Estos resultados contradictorios pueden explicarse teniendo en cuenta tanto la naturaleza del tratamiento realizado a las semillas, como el principio en el cual se basa la prueba de CE para la estimación del PG. En lo que respecta a la prueba, los valores de conductividad eléctrica definidos como valores “de corte” para la clasificación de las semillas (vigorosas, no vigorosas con capacidad para germinar, no viables y duras) se basan en la lixiviación de electrolitos al medio (agua deionizada) ocurrida durante la incubación de las semillas individuales. Bajo este concepto, cuanto más saludables e íntegras se encuentran las semillas, más rápidamente ocurrirá la reorganización de sus membranas celulares y se alcanzará la homeostasis celular durante la imbibición, permitiendo correlacionar rangos entre 10 y 180 y entre 180 y 240 $\mu\text{Si}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{semilla}^{-1}$ para las estimaciones de vigor y PG en soja, respectivamente (INTA, 1997). Por otro lado, las semillas duras impermeables presentarán poca lixiviación de electrolitos al medio (< 10 de $\mu\text{Si}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{semilla}^{-1}$) y, en el otro extremo, semillas no viables, de mala calidad o dañadas, como es el caso de las semillas sometidas al tratamiento, se espera que presenten menor capacidad de reorganización y equilibrio celular y, en consecuencia, mayor cantidad de electrolitos lixiviados según la severidad del daño (> 240 de $\mu\text{Si}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{semilla}^{-1}$). Por lo tanto, tal como fue propuesto por Craviotto et al. (2009) para

semillas con tegumento dañado, se concluyó que este método no representó la condición real de calidad de las semillas T, motivo por el cual además, se decidió finalizar su aplicación a los 90 DDT.

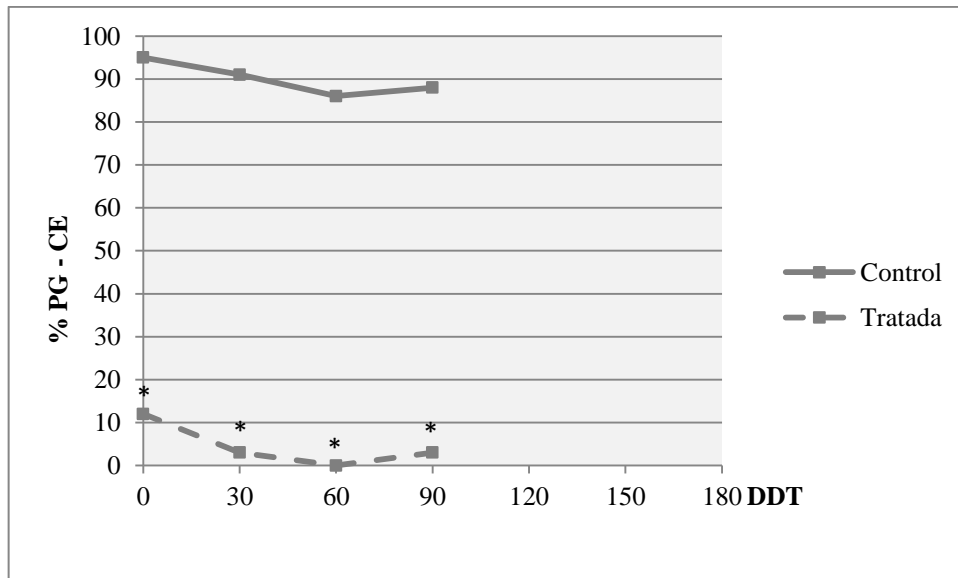


Figura 13: Poder Germinativo (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 90 días después de tratamiento (DDT) evaluada por la prueba de Conductividad Eléctrica (CE). Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

Estos resultados resaltan también la importancia del criterio en la toma de muestra de tejido seminal correspondiente al tratamiento. Según Shelar et al. (2008), la orientación del embrión dentro de las semillas y la naturaleza protectora del tegumento son atributos importantes para las semillas de soja frente a posibles fracturas, siendo el daño mecánico durante la cosecha el principal factor detrimental que afecta la calidad de estas semillas (Neto y West, 1989). Adicionalmente, Shelar et al. (2008) establecieron que, si bien un daño en los cotiledones puede afectar la translocación de nutrientes esenciales al eje embrionario en crecimiento, retrasando el crecimiento de la plántula, el daño extremo del eje embrionario podría resultar en plántulas anormales con fallas de germinación. De acuerdo a estos antecedentes, en todos los casos, se consideró la mínima porción de extracción de tejido posible para minimizar el daño. Por tal motivo la ubicación cuidadosa y estratégica de perforación a nivel de los cotiledones tuvo por objetivo evitar el daño directo en el eje embrionario de las semillas, siendo éste el principal órgano involucrado en la germinación de las mismas.

- Vigor

El último y más exigente atributo de calidad fisiológica estudiado fue el Vigor de las semillas. Para ello, se realizó una estimación inicial a partir de la EG, evaluada como el número de plántulas normales a los 5 días de incubación en condiciones ideales de germinación. También se emplearon las metodologías de EA, CE y Tz. Los valores y sus respectivas significancias en semillas T respecto al C se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores promedio de Vigor medidos por EG, CE, EA y Tz. Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

DDT	Tratamiento	% vigor por EG	% vigor por EA	% vigor por CE	% vigor por Tz
0	C	65	84	47	98
	T	79	61*	2*	82*
30	C	89	74	60	96
	T	64*	45*	0*	80*
60	C	90	86	59	90
	T	79*	74*	0*	80
90	C	91	88	64	90
	T	82*	64*	0*	76
180	C	66	80	-	62
	T	48*	71	-	24*

Para el caso de la EG, la evolución de este atributo (Fig. 14) siguió el mismo patrón observado tanto para Viabilidad como para PG. Nuevamente, los valores hallados para las semillas T no difirieron significativamente al inicio del experimento y sí lo hicieron para 30, 60, 90 y 180 DDT respecto al C, mostrando una caída sostenida durante el tiempo de almacenamiento para ambas condiciones.

Respecto al vigor medido por EA, tanto las semillas T como C presentaron valores levemente decrecientes en el tiempo (Fig. 15), validando una vez más las buenas condiciones de almacenamiento de las semillas durante el experimento. Por otro lado, los resultados muestran valores significativamente menores para las semillas T respecto a las C (Tabla 3) aún en el momento inicial del experimento y hasta los 90 DDT, lo que podría explicarse teniendo en cuenta las condiciones metodológicas más estresantes de esta prueba. Naturalmente, el daño en la semilla impuesto por el proceso de extracción de tejido se hace más evidente cuando estas semillas son sometidas a condiciones de germinación más exigentes.

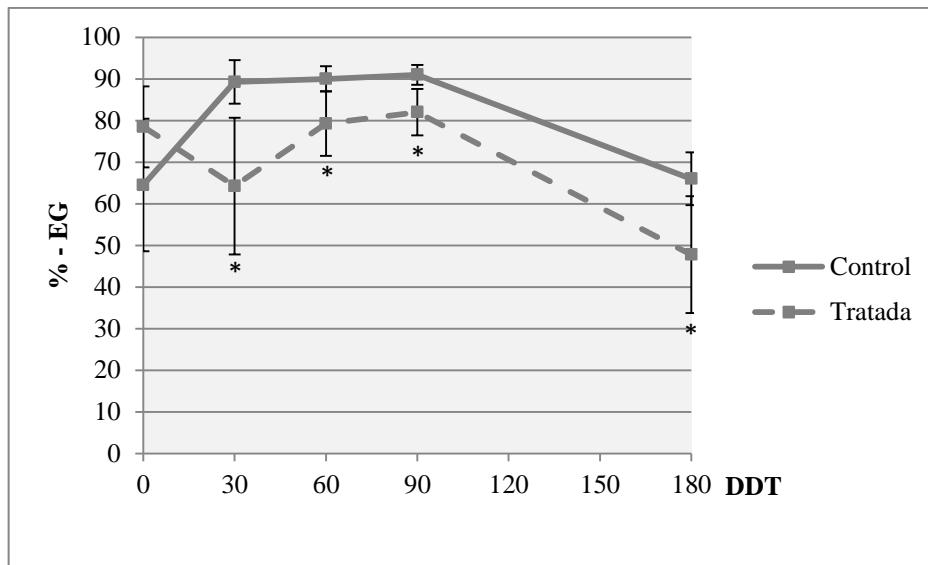


Figura 14: Energía Germinativa (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) medida como plántulas normales a los 5 días de germinación. Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

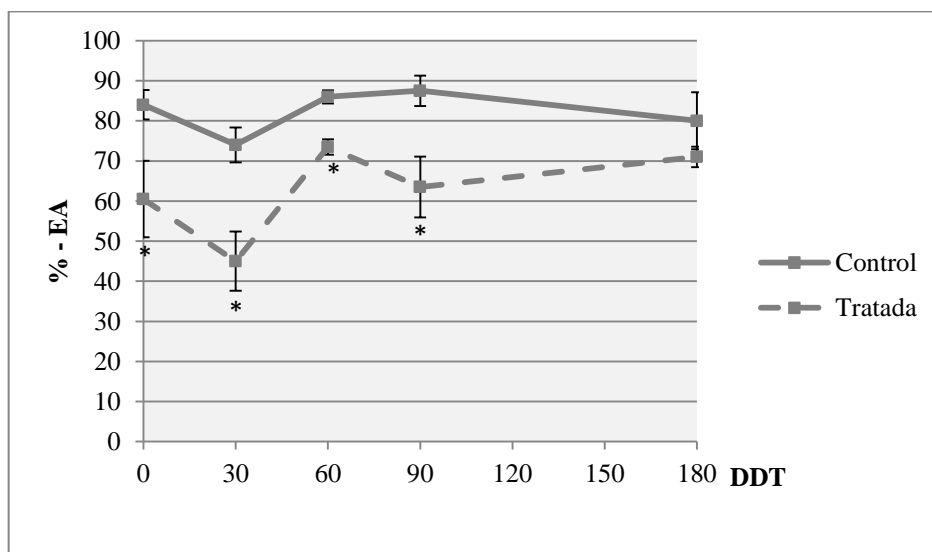


Figura 15: Vigor (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) medido por la prueba de Envejecimiento Acelerado (EA). Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

La misma conclusión general se atribuyó al caso de los resultados de vigor por CE (Tabla 3), donde el daño ocasionado por la perforación a las semillas proporcionó un lixiviado excesivo de electrolitos al medio de incubación que no reflejó las condiciones reales de calidad fisiológica de las mismas (Fig. 16).

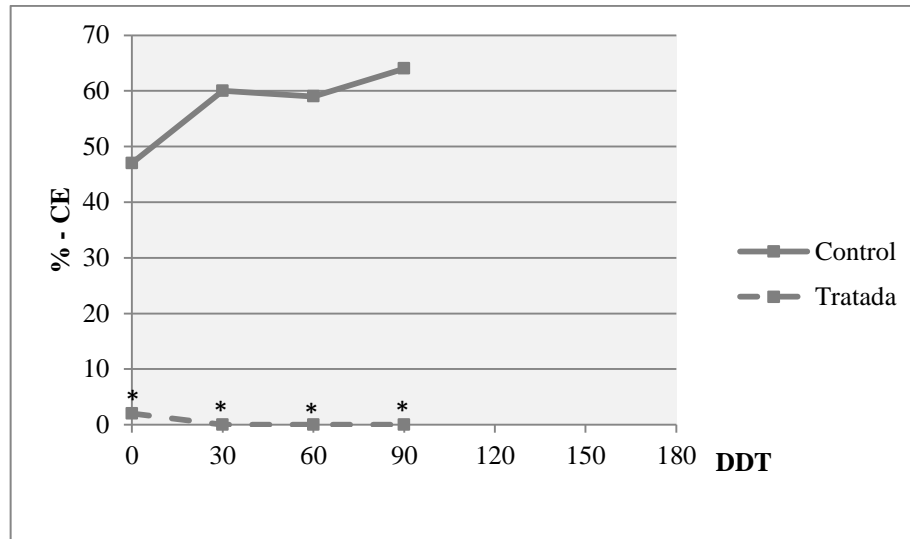


Figura 16: Vigor (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 90 días después de tratamiento (DDT) medido por la prueba de Conductividad Eléctrica (CE). Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

Finalmente, los valores de vigor determinados por la prueba de Tetrazolio (Tabla 3) mostraron la misma tendencia decreciente general, más pronunciada para semillas T que para semillas C (Fig. 17).

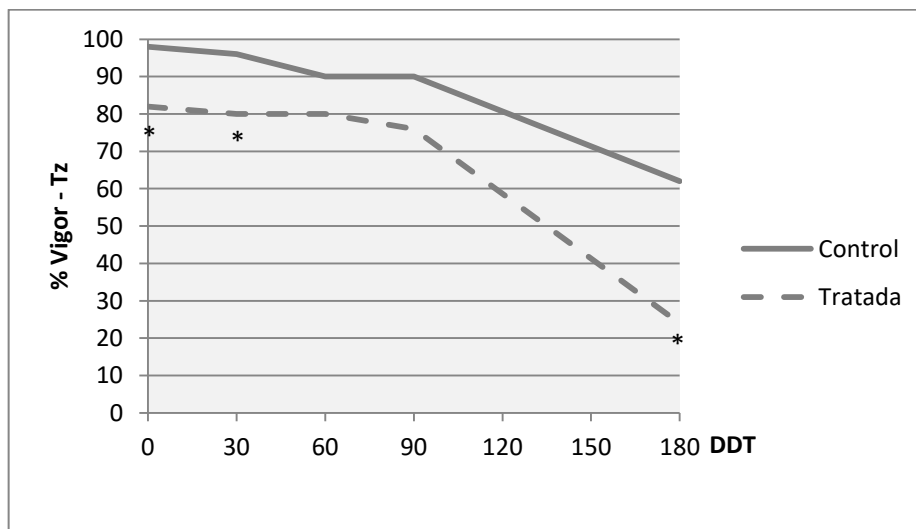


Figura 17: Vigor (%) de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) medido por la prueba de Tetrazolio (Tz). Los valores con un * indican diferencias significativas respecto a su control ($p < 0,05$).

Esta metodología permite además clasificar categorías de vigor en las semillas como alto (A, semillas viables sin defectos y con defectos leves), medio (B, semillas viables con defectos moderados) y bajo (C, semillas viables con defectos severos). Para el caso de las semillas T no se evidenció semillas clasificadas dentro de la categoría A en ninguno de los

tiempos de evaluación debido al tratamiento propiamente dicho (Fig. 18), en tanto la categoría C correspondió al 100 % de las semillas T para el resultado de vigor a los 180 DDT. Contrariamente, en el resultado de vigor para el control hasta los 90 DDT, las semillas correspondientes a la categoría A constituyeron la mayor proporción, incrementándose el número en la categoría B a los 180 DDT. Estos resultados brindan información topográfica del daño en las semillas, indicando claramente un efecto nocivo en las mismas como consecuencia del tratamiento de perforación, aunque la capacidad de germinación y establecimiento en plántulas normales parecería no estar siendo severamente comprometida.

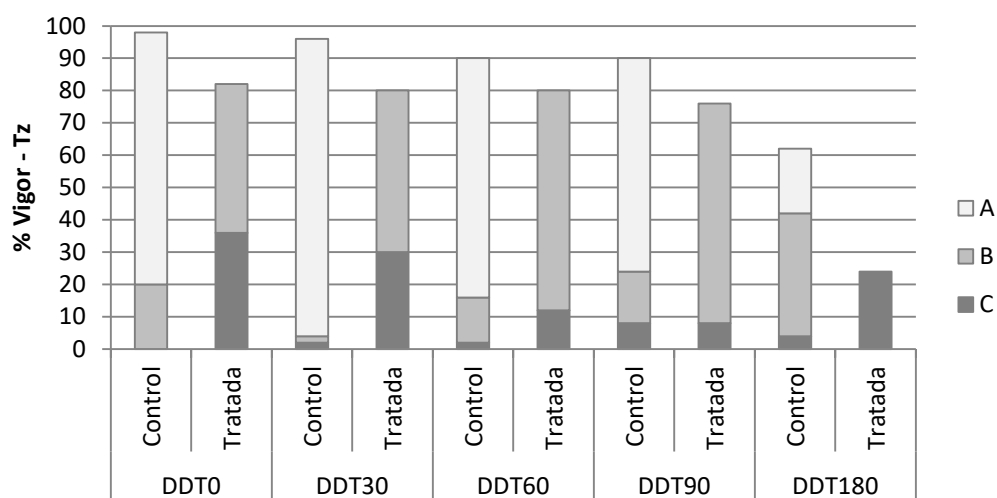


Figura 18: Clasificación de Vigor de semillas tratadas (T) y control (C) durante 180 días después de tratamiento (DDT) medido por la prueba de Tetrazolio (Tz). Las categorías de clasificación de Vigor según ISTA (2009) corresponden a: A (alto), B (medio) o C (bajo).

Germinación y establecimiento de las plantas a campo

A modo de confirmación de la calidad fisiológica de las semillas sometidas al tratamiento y validación de la implementación del protocolo para análisis moleculares a partir de extractos de tejido seminal, se sembraron las semillas T y C, evaluando la emergencia y posterior desarrollo de plántulas en el campo (Fig. 19). La siembra se realizó a los 90 DDT de acuerdo a las fechas óptimas de siembra para la especie, a fin de poder evaluar el comportamiento a campo bajo condiciones propicias para el cultivo. Se sembraron 3 réplicas de 2 surcos de 2 m de largo cada uno, con una separación entre surcos de 0,52 m y una densidad de siembra de 45 plantas.m⁻². Tal como se observa en la Fig. 19, tanto las semillas T como las C dieron plántulas visiblemente normales, sin mostrar diferencias en número ni

calidad de plántulas emergidas. A los 10 días de la siembra se realizó el conteo, obteniendo un promedio de emergencia de 92 y 96% en las T y C, respectivamente.

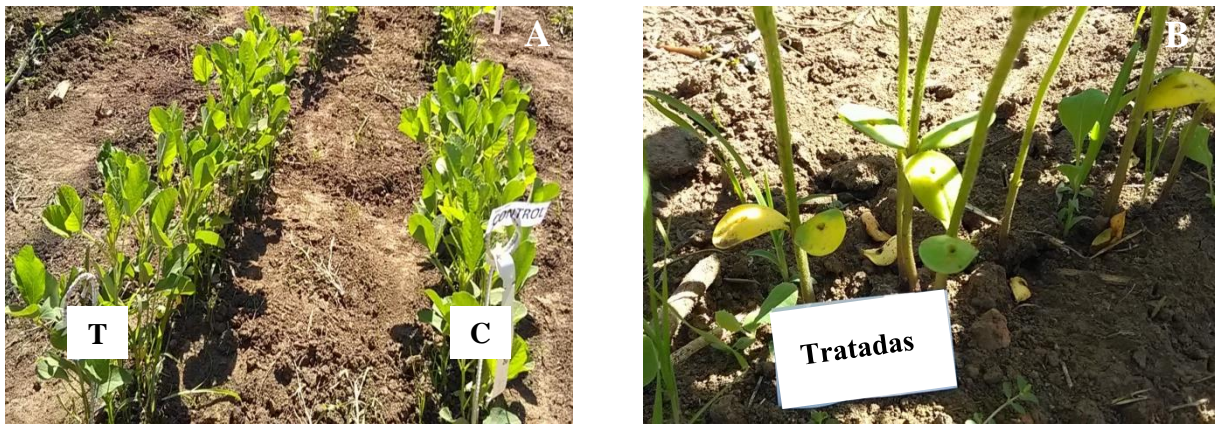


Figura 19: A- Emergencia a campo de semillas Tratadas (T, izquierda) y control (C, derecha). B- Se observa el daño ocasionado en los cotiledones por el tratamiento para la extracción de tejido.

CONCLUSIONES

- La pequeña porción de tejido seminal extraído fue suficiente para la obtención de muestras de ADN de cantidad y calidad adecuada para su uso en análisis moleculares basados en PCR.
- Los atributos de calidad fisiológica evaluados mostraron que, si bien el tratamiento de extracción de tejidos afectó sutilmente la calidad de las semillas, en ningún caso hubo un compromiso en cuanto a la capacidad de germinación de las mismas. Caso contrario sucede con la prueba de CE donde se confirmó la invalidez de aplicación de dicha técnica por cuestiones inherentes al principio utilizado en el criterio de estimación de parámetros de calidad fisiológica.
- La siembra de las semillas luego de 90 días de ser sometidas al tratamiento de extracción de tejido no mostró diferencias en cuanto al número de plántulas normales emergidas respecto a las semillas control.

Se concluye por lo tanto que, el protocolo para análisis moleculares a partir de una muestra de tejido seminal es viable para ser implementado en los programas de mejoramiento genético en soja, permitiendo la adecuada germinación de las semillas seleccionadas por dicho método y el posterior establecimiento y desarrollo de plantas. Esto proporcionaría eficiencia y reducción de tiempo, espacios y costos, ofreciendo grandes ventajas al programa de mejoramiento en general.

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso Lozano, M. (2019). El desafío de la edición génica en plantas. <http://hdl.handle.net/10261/181186>

Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *TRENDS in Biotechnology*, 20(5), 215-223.

Ben-Ari, G. y Lavi, U. (2012). Marker-assisted selection in plant breeding. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 163–184. doi:10.1016/b978-0-12-381466-1.00011-0

Bolsa de Cereales, 2019. <http://www.bolsadecereales.com/imagenes/informes/2018-09/68-paneliiiestebancopati.pdf>

Bolsa de Comercio de Rosario, (2019). <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones>

Botstein D.; White R.L.; Skolnick M. y Davis W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

Casini, C. y Bragachini M. (2005). Soja. Eficiencia de Cosecha y Postcosecha. INTA Precop Manual Técnico N° 3. Ediciones INTA.

Craviotto, R.; Arango Perearneau, M. y Gallo, C. (2008). Prueba topográfica por tetrazolio en Soja. Ed. Guillermo Rolando. 96 pp.

Craviotto, R.M.; Salinas, A.R.; Arango Perearnau, M.R. y Ferrari, S.A. (2009). Influencia de propiedades físicas sobre la conductividad eléctrica de semillas individuales de soja Glycine Max [L.] Merrill. Physical factors influencing the electrical conductivity of single soybean Glycine max [L.] Merrill seeds. RCA. Revista científica agropecuaria.

El-Abady, M.I.; El-Emam, A.A.M.; Seadh, S.E. y Yousof, F.I. (2012). Soybean Seed Quality as Affected by Cultivars, Threshing Methods and Storage Periods. *Research Journal of Seed Science* 5 (4): 115-125.

Ellis, R.H. (2019). Temporal patterns of seed quality development, decline, and timing of maximum quality during seed development and maturation. *Seed Science Research*, 1-8.

Fabrizius, E.; Tekrony, D.M.; Egli, D.B. y Rucker, M. (1999). Evaluation of viability model for prediction soybean seeds germination during warehouse storage. *Crop Science*, 39:194-201.

Fehr, W.R. (1987). *Principles of cultivar development: crop species*. Macmillan publishing company.

García, J.L.C. y Paredes, A.L. (2012). Los cultivos transgénicos en la agricultura. Su relación con el medio natural. *Desarrollo local sostenible*, (15).

Giancola, S.M. (1998). "Caracterización y diferenciación de Germoplasma de Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) mediante marcadores moleculares". Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Gómez, J.A.M.; Osuna, M.A.I.; Plascencia, G.Y. y de la Barca, A.M.C. (2003). Detección por PCR de un transgen en productos de soya utilizados para formular alimentos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(4), 263-269.

Herrera-Estrella, L.; De Block, M.; Messens, E.H.J.P.; Hernalsteens, J.P.; Van Montagu, M. y Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO journal*, 2(6), 987-995.

INASE (2018). Resolución EX-2018-65544686-APN-DSA#INASE

Infoagro. <https://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>

InfoStat (2018). InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

INTA. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria (1997). Analizador Automático de Semillas SAD 9000-S. Según normas ISO 9001:2008 e ISO 17025. Tecnología de Semillas generada por el INTA EEA Oliveros y Grupo Consultar.

International rules for seed testing (2019). International Rules for Seed Testing, Full Issue i-19-8 (300) <https://doi.org/10.15258/istarules.2019.F>

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Banks, D. N. A. Pocket K No. 19: Molecular Breeding and Marker-Assisted Selection. International Service

for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
<https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/19/default.asp>

Johnson, H.W. y Bernard, R.L. (1962). Soybean genetics and breeding. In Advances in agronomy (Vol. 14, pp. 149-221). Academic Press.

Korzun, V. (2003). Molecular markers and their applications in cereals breeding. A paper presented during the FAO international workshop on “Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?”. October 2003, Turin, Italy.

Kuiper, H.A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. Food control, 10, 339-349.

Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Lipp, M.; Brodmann, P.; Pietsch, K.; Pauwels, J.; Anklam, E.; Borchers, T. y Fagan, J. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. Journal-AOAC International, 82, 923-928.

Neto, J.F. y West, S.H. (1989). Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. Journal of Seed Technology, 122-135.

Piquín, A. (1968). Soja: cultivo del futuro argentino. Revista Bolsa de Cereales 2811: 38-43.

Rafalski A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Curr Opin Plant Biol 5: 94-100.

Ridner, E. (2006). Soya, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Grupo QSA, Sociedad Argentina de Nutrición, Buenos Aires.

Rogstad, S.H. (1996). Assessing genetic diversity in plants with synthetic tandem repetitive DNA probes. In Genomes of plants and animals (pp. 1-14). Springer, Boston, MA.

Shelar, V.R.; Shaikh, R.S. y Nikam, A.S. (2008). Soybean seed quality during storage: a review. Agric. Rev, 29(2), 125-131.

Strada, J. y Vila, I. A. (2015). La producción de soja en Argentina: causas e impactos de su expansión. La revista del CCC, (23). Disponible en línea: <https://www.centrocultural.coop/revista/23/la-produccion-de-soja-en-argentina-causas-e-impactos-de-su-expansion>

Teubal, M. (2008). “Soja y agronegocios en la Argentina: la crisis del modelo”, en Laboratorio/n line, Gino Germani, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina, vol. X, n°22.

Vos P.; Hogers R.; Bleeker M.; Reijans M.; Van de Lee T.; Hornes M.; Frijters A.; Pot J.; Kuiper M. y Zabeau M. (1995). AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414.

Wang, H.W.; Zhang J.S.; Gai J.Y. y Chen S.Y. (2006). Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean. Theor. Appl. Genet. 112:1086–1097. doi:10.1007/s00122-006-0210-9

Welsh J. y McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18: 7213-7218.

Williams J.G.K.; Kubelik A.R.; Livak K.J.; Rafalski J.A. y Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6531-6535.

Ybran, R. y Lacelli, G., (2016) Informe estadístico mercado de la soja. Boletín Técnico INTA, 1–9. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.pdf

Zanakis, G. N.; Ellis, R. H. y Summerfield, R. J. (1994). Seed quality in relation to seed development and maturation in three genotypes of soyabean (*Glycine max*). Experimental Agriculture, 30(2), 139-156.

Zeni, E.R. (1971). El cultivo sagrado. Revista Bolsa de Cereales 2845: 3-7.

ANEXO 1 - Análisis Estadísticos para Viabilidad y PG

Tinción por tetrazolio

Prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones

Se consideran éxitos a valores: distinto que ... (0,000000)

DDT0

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Trat	viabilidad	Control	Tratada	50	50	0,98	0,90	0,08	0,1155

DDT30

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Trat	viabilidad	Control	Tratada	50	50	0,98	0,96	0,02	0,6212

DDT60

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Trat	viabilidad	Control	Tratada	50	50	0,92	0,92	0,00	>0,9999

DDT90

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Trat	viabilidad	Control	Tratada	50	50	1,00	0,94	0,06	0,1212

DDT180

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Trat	viabilidad	Control	Tratada	50	50	0,82	0,74	0,08	0,3483

Poder germinativo

Prueba de Kruskal Wallis

DDT0

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PG	Control	8	89,75	4,59	91,00	1,46	0,2412
PG	Tratada	8	86,00	5,86	87,00		

DDT30

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PG	Control	8	89,00	3,21	89,00	10,94	0,0003
PG	Tratada	8	66,25	15,76	66,00		

DDT60

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PG	Control	8	94,25	1,98	94,00	6,35	0,0085
PG	Tratada	8	87,50	5,93	88,00		

DDT90

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PG	Control	8	91,50	2,98	92,00	7,75	0,0026
PG	Tratada	8	84,00	4,78	85,00		

DDT180

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PG	Control	8	84,75	5,12	83,00	1,00	0,3316
PG	Tratada	8	81,75	8,78	82,00		

Conductividad eléctrica

Prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones

Se consideran éxitos a valores: menores que ... (240,000000)

DTT0

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,95	0,12	0,83	<0,0001

DTT30

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,91	0,03	0,88	<0,0001

DTT60

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,86	0,00	0,86	<0,0001

DTT90

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,88	0,03	0,85	<0,0001

ANEXO 2 - Análisis Estadísticos para Vigor

Energía germinativa

Prueba de Kruskal Wallis

DDT0

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Energía	Control	8	64,50	15,92	71,00	2,48	0,1170
Energía	Tratada	8	78,50	9,72	80,00		

DDT30

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Energía	Control	8	89,25	5,23	92,00	9,60	0,0008
Energía	Tratada	8	64,25	16,44	65,00		

DDT60

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Energía	Control	8	90,00	3,02	91,00	8,04	0,0028
Energía	Tratada	8	79,25	7,78	80,00		

DDT90

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Energía	Control	8	91,00	2,39	91,00	8,04	0,0036
Energía	Tratada	8	82,00	5,55	83,00		

DDT180

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Energía	Control	8	66,00	6,32	65,00	6,35	0,0093
Energía	Tratada	8	47,75	14,04	46,00		

Envejecimiento Acelerado

Prueba de Kruskal Wallis

DDT0

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
EA	Control	4	84,00	3,65	84,00	5,33	0,0286
EA	Tratada	4	60,50	9,57	63,00		

DDT30

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
EA	Control	4	74,00	4,32	75,00	5,33	0,0286
EA	Tratada	4	45,00	7,39	46,00		

DDT60

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
EA	Control	4	86,00	1,63	86,00	5,33	0,0286
EA	Tratada	4	73,50	1,91	73,00		

DDT90

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
EA	Control	4	87,50	3,79	89,00	5,33	0,0286
EA	Tratada	4	63,50	7,55	62,00		

DDT180

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
EA	Control	4	80,00	7,12	82,00	2,52	0,1429
EA	Tratada	4	71,00	2,58	71,00		

Conductividad eléctrica

Prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones

Se consideran éxitos a valores: menores o iguales que ... (180,000000)

DDT0

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,50	0,02	0,48	<0,0001

DDT30

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,64	0,00	0,64	<0,0001

DDT60

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,60	0,00	0,60	<0,0001

DDT90

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	CE	Control	Tratada	100	100	0,64	0,00	0,64	<0,0001

Tinción por Tetrazolio

Prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones

Se consideran éxitos a valores: mayores que ... (0,000000)

DDT0

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	Vigor	Control	Tratado	50	50	0,98	0,82	0,16	0,0084

DDT30

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	Vigor	Control	Tratado	50	50	0,96	0,80	0,16	0,0158

DDT60

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	Vigor	Control	Tratado	50	50	0,90	0,80	0,10	0,1764

DDT90

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	Vigor	Control	Tratado	50	50	0,90	0,76	0,14	0,0697

DDT180

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p1	p2	p1-p2	p(2 colas)
Tratamiento	Vigor	Control	Tratado	50	50	0,62	0,24	0,38	0,0001