



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Aspectos ecofisiológicos y moleculares de la
incorporación de las características hoja lanceolada y alto
porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma
elite de soja**

Ing. Agr. Julieta Sofía Bianchi

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

Director: Ing. Agr. Eligio N. Morandi

Co-Directores: Dr. Alvaro Quijano

Dr. Carlos O. Gosparini

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA INCORPORACIÓN DE LAS
CARACTERÍSTICAS HOJA LANCEOLADA Y ALTO PORCENTAJE DE VAINAS DE
CUATRO SEMILLAS A GERMOPLASMA ELITE DE SOJA**

Julieta Sofía Bianchi

Ingeniera Agrónoma-Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario durante el período comprendido entre 1 de Abril de 2013 y el 23 de Marzo de 2018, bajo la dirección del Ing. Agr. Eligio N. Morandi y la co-dirección de los Drs. Carlos O. Gosparini y Alvaro Quijano.

Ing. Agr. Julieta S. Bianchi

Doctorando

Ing. Agr. Eligio N. Morandi

Director

Dr. Carlos O. Gosparini

Co-director

Dr. Alvaro Quijano

Co.director

Defendida: 23 de Marzo de 2018.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerle al Ing. Agr. Eligio N. Morandi por haberme permitido desarrollar este trabajo de Tesis junto a todo el equipo de Fisiología Vegetal. Por haber confiado en mí y en mis capacidades para resolver los distintos desafíos que se fueron planteando durante el transcurso de la Tesis. Por alentarme cuando las cosas se ponían difíciles y alegrarse conmigo de los logros alcanzados. Por haberme inculcado que en ciencia no hay que temer a cuestionar los paradigmas, y que es justamente a partir de esos cuestionamientos que avanza el conocimiento. Gracias por enseñarme a PENSAR, a buscar las respuestas más allá de un resultado, por haberme brindado todo su conocimiento y experiencia. Y por sobre todo, gracias por haberme dado la posibilidad de trabajar en este proyecto, porque el anhelo de ver las vainas de cuatro semillas en los cultivares de soja, fue el motor y la energía suficiente para atravesar todos los obstáculos.

Quisiera agradecer a mis Co-Directores. A Alvaro por su incondicional ayuda en los trabajos de campo, como así también en la parte de análisis de datos, discusión y escritura de la Tesis. Gracias por la paciencia y por el apoyo en todo momento. A Cachito, por acompañarme siempre que necesite ayuda tanto en el campo, como en los invernáculos. Gracias por la predisposición para llevar adelante cualquier tarea inclusive cuando las actividades había que hacerlas un 31 de Diciembre. Gracias por todos los asados compartidos, en especial con nuestro querido Jorgito!

Gracias a las LabGirls, Mariana, Amalia y Nidia, que aportaron desde diferentes lugares en mi formación. Gracias Marianita por la ayuda en la parte molecular, por la paciencia cuando los geles no daban y tu constante motivación. Gracias Ni por haberme entrenado en la parte de cruzamientos y por haber hecho parte de ellos, por los cursos compartidos y las infinitas charlas que tuvimos.

Gracias a los Fisiólogos Cachito Cairo y Ricardo Martignone, que estuvieron siempre predisuestos a responder a mis interrogantes y en especial a leer la Tesis! Al grupo de Cultivos Extensivos por su apoyo diario y su cariño, en especial a Ire, porque gracias a ella descubrí la docencia y realicé mis primeros ensayos en Girasol y Soja.

Parte del desarrollo experimental no podría haber sido posible sin la ayuda de todos los alumnos que colaboraron en el procesamiento de las plantas. Gracias infinitas a los que estuvieron todos los días, Tana, Guille, Juli, y muchos más que sería extenso nombrarlos a todos. A todos los pasantes de las prácticas Pre-Profesionales, que siempre han mostrado un gran interés para las distintas actividades que se fueron planteando. Y en especial, a mi amiga, ayudante, mi mano derecha Cele, a quien le voy a estar eternamente agradecida por su gran colaboración durante más de tres años.

No quiero dejar de agradecer a todos los docentes que colaboraron en mi formación de grado y de posgrado de esta casa de estudio que tanto respeto y quiero. En especial al grupo de genética, al Dr. Guillermo Pratta y a la Dra. Liliana Picardi, por su gran predisposición a la hora de contestar todas mis inquietudes.

A mis amigos de la Facu, que el Posgrado nos volvió a juntar en varias oportunidades, Flor, Bari y Mara. Por todos los momentos de risas y de estrés compartidos. A mis amigas de la vida Car, Vir, Dani, Na y Sol que aunque mucho no entiendan, siempre me estuvieron acompañando y alentando.

Además quiero agradecer a mi hermosa familia, a mis papás por haberme inculcado que todo se logra con esfuerzo y voluntad, por haberme dado la posibilidad de estudiar y apoyarme cuando decidí emprender este proyecto. A mi hermano y su hermosa familia, en especial a Mati, quien en los momentos de mayor tensión con su dulzura y amor me llenó y me llena de felicidad. No quiero olvidarme de mis tíos, primos, que siempre estuvieron pendientes de todos mis logros. Y en especial a mis mamás del corazón, mis abuelas Daria y Pocho.

Finalmente, gracias mi amor por apoyarme desde el primer día, por contenerme y alentarme siempre en todo lo que hago, porque lo más lindo de los logros es compartirlos con la persona que uno ama.

A todos, Muchas Gracias!!!

“Todo logro comienza con la decisión de intentarlo”

DEDICATORIA

A mi gran amor y compañero incondicional, Martín

A mi familia y amigos

CREACIONES FITOGENÉTICAS, PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- CREACIONES FITOGENÉTICAS

Inscripción en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares, del Instituto Nacional de Semillas (INASE) del Ministerio de Agroindustria, del genotipo de soja TANGO 4S. Técnicos creadores: EN Morandi, CO Gosparini, NH Montechiarini, JS Bianchi y A Quijano. Patrocinante: EN Morandi. Exp. S 05:0043033/2016. Solicitantes/Propietarios: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Universidad Nacional de Rosario. Inscripción realizada a los efectos de proteger la propiedad intelectual del material genético a ser utilizado como dador de la característica alto porcentaje de frutos de cuatro semillas en planes de mejoramiento genético de soja.

- TRABAJOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

1. "Seed-per-pod estimation for plant breeding using deep learning". Uzal, L.C., Grinblat, G.L., Namías, R., Larese, M.G., **Bianchi, J.S.**, Morandi, E.N. & Granito, P.M. Expert Systems With Applications. Manuscript number: ESWA-D-17-05063 (Enviado, Dic. 2017).

- TRABAJOS EN PREPARACIÓN

1. "Lanceolate leaflet enhance the R/FR ratio within the canopy and increase pod initiation, maturity pod number and yield in soybean crop". **Bianchi, J.S.**, Quijano, A., Gosparini, C.O. & Morandi, E.N. Manuscrito en etapa final de redacción.

- PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1. **Julieta S Bianchi**, Celeste D Ceriatti, Laureano M Álvarez, Alvaro Quijano, Carlos O Gosparini, Eligio N Morandi. Leaflet shape, canopy light environment and yield components in soybean. World Soybean Research Conference 10 (WSRC 10). Savannah. Georgia. USA. 10-15 Septiembre, 2017. Resúmenes on-line, página de la

WSRC 10 (www.wsrc10.net) y luego estarán accesibles en un link de la Soy Base (www.soybase.org).

2. **Bianchi, Julieta S.**; Ceriatti, Celeste D.; Millet, Federico; Baggio, Diego D.; Alesandrelli, Leandro A.; Quijano, Alvaro; Morandi, Eligio N. Producción y partición de asimilados durante el llenado de las semillas en isolíneas de soja con folíolos lanceolados y oblongos. Publicación Periódica Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe. 5 y 6 de Diciembre de 2016.
3. **Bianchi Julieta**, Ceriatti Celeste, Quijano Alvaro, Morandi Eligio. Arquitectura del canopeo, radiación fotomorfogénica y fructificación en soja. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. “Enfrentando el cambio climático, haciendo sostenible la productividad agro-forestal”. Corrientes, Argentina. 13-16 de Noviembre 2016.
4. **Bianchi, Julieta S.**; Ceriatti, Celeste D.; Talavera, Matías A.; Lagorio, Mariano; Escalada, Juan F.; Quijano, Alvaro; Morandi, Eligio N. Efecto del cambio en la estructura del canopeo y del número de semillas por vaina sobre el rendimiento en soja. Publicación Periódica Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe. 30 de Noviembre y 1 de Diciembre de 2015. Tipo de presentación: Póster.
5. **Bianchi, Julieta S.**; Feresin, Cecilia E.; Sanchez, Juan Manuel; Uviedo, Facundo; Forneris, Marie France; Martinez, Mailen; Quijano, Alvaro; Morandi, Eligio N. Rendimiento comparado de isolíneas de soja con diferente forma de hoja y número de semillas por fruto. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe. Diciembre 2014. Tipo de presentación: Póster.
6. **Bianchi Julieta Sofía**, Ceriatti, Celeste Daniela, Buccella Giuliana, Quijano Alvaro, Morandi Eligio Natalio. Evaluación del rendimiento de líneas con diferente forma de hoja y número de semillas por fruto en soja. XV Congreso Latinoamericano. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. “Fisiología Vegetal: aportes a los desafíos energéticos, productivos, y socio-ambientales de la próxima década”. Mar del Plata, Argentina. 21-24 Septiembre 2014. Tipo de presentación: Póster.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	XII
Resumen	XIV
Abstract	XVI
Estructura de la tesis	XVII
Objetivo general de la tesis	XVIII
Hipótesis general de la tesis	XVIII

CAPÍTULO I:

“Aspectos ecofisiológicos de la incorporación de las características hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja”	19
---	-----------

I.1. INTRODUCCIÓN	19
--------------------------	-----------

Soja: Orígenes e importancia en Argentina	19
Componentes del rendimiento en el cultivo de soja	20
Número promedio de semillas por vaina (NPSV)	21
Estructura del canopeo: su relación con la tasa de crecimiento del cultivo y la distribución espectral de la luz	24
Número de estructuras reproductivas en soja: su relación con la tasa de crecimiento del cultivo y la distribución espectral de la luz	25
Morfología Foliar: su relación con la estructura del canopeo y con los componentes del rendimiento.	28

I.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	34
-----------------------------------	-----------

Objetivos Ecofisiológicos Específicos	34
Hipótesis Ecofisiológicas Específicas	34

I.3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
----------------------------------	-----------

Material Vegetal	35
Diseño Experimental	36
Mediciones de radiación fotosintética y fotomorfogénica y parámetros de crecimiento	37

I.4. RESULTADOS	41
------------------------	-----------

Morfología foliar: su relación con parámetros de crecimiento	41
Morfología foliar: su efecto sobre la evolución de la relación R/RL y la RFA en los estratos medios del canopeo	47
Morfología foliar: su relación con el número de vainas iniciadas	50
Morfología foliar: Relación destino-fuente y partición de materia seca en R5	54
Rendimiento: componentes y su relación con la morfología foliar	56
Relación entre el número de semillas por unidad de superficie (NSS) y sus componentes, número de vainas por unidad de superficie (NVS) y número promedio de semillas desarrolladas por vaina (NPSV _D)	59

I.5. DISCUSIÓN:	61
Efectos de la morfología foliar sobre parámetros de crecimiento y el ambiente lumínico de los canopeos	61
Efectos de la morfología foliar sobre la iniciación de vainas	64
Efectos de la morfología foliar sobre la relación destino-fuente y partición en R5	68
Rendimiento: componentes y su relación con la morfología foliar	69

I.6. CONCLUSIONES	74
--------------------------	----

CAPÍTULO II

“Aspectos moleculares de la incorporación de las características hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja”	75
---	----

INTRODUCCIÓN GENERAL	75
-----------------------------	----

Marcadores Genéticos. Concepto. Clasificación	75
Marcadores morfológicos	76
Marcadores bioquímicos	76
Marcadores moleculares	77
Mejoramiento vegetal asistido por marcadores moleculares	79
Selección asistida por marcadores moleculares para caracteres cualitativos	81
Selección asistida por marcadores moleculares para caracteres cuantitativos	81
QTL. Concepto y análisis	82
Análisis de un solo marcador	83
Análisis de mapeo por intervalos simples	83
Análisis de mapeo por intervalos compuestos	84
QTL. Estrategias para su detección rápida	84

CAPÍTULO II: SECCIÓN 1

“Caracterización genética y molecular del carácter forma de hoja”	87
--	----

II.1.1. INTRODUCCIÓN	87
-----------------------------	----

II.1.2. OBJETIVOS	91
--------------------------	----

Objetivo Molecular Específico	91
-------------------------------	----

II.1.3. MATERIALES Y MÉTODOS	92
-------------------------------------	----

Material Vegetal	92
Genotipos parentales y poblaciones segregantes	92
Caracterización fenotípica de los parentales y de la población segregante F ₂ J14	96
Ensayo de progenie	96
Análisis de segregación	97
Caracterización molecular	97

Extracción del ADN genómico	97
Amplificación de Repeticiones de Secuencias Simples (Microsatélites)	99
Separación de los productos de amplificación y visualización por tinción con nitrato de plata	100
Búsqueda de polimorfismos y análisis de la segregación de los marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) en la población F ₂ J14	102
Análisis de ligamiento	102
II.1.4. RESULTADOS	104
Caracterización fenotípica de los parentales y de la población F ₂ J14. Análisis de segregación	104
Caracterización molecular	106
Extracción del ADN genómico.	106
Búsqueda de polimorfismos en marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) entre los parentales de la población F ₂ J14	107
Análisis de la segregación de los marcadores moleculares microsatélites en la población F ₂ J14	109
Análisis de ligamiento	111
II.1.5. DISCUSIÓN	114
II.1.6. CONCLUSIONES	118
CAPÍTULO II: SECCIÓN 2	
“Caracterización genética y molecular del carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas”	119
II.2.1. INTRODUCCIÓN	119
II.2.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	124
Objetivos Moleculares Específicos	124
Hipótesis Molecular Específica	124
II.2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	125
Material Vegetal	125
Poblaciones segregantes	125
Diseño Experimental y experimentos en el campo	125
Caracterización fenotípica de parentales, híbridos y poblaciones segregantes	126
Análisis Fenotípico	127
Caracterización Molecular	128
Extracción del ADN genómico	128
Amplificación de Repeticiones de Secuencias Simples (Microsatélites)	128

Separación de los productos de amplificación y visualización por tinción con nitrato de plata.	131
QTLs: Métodos para su detección rápida: Análisis de Segregantes en Grupo	131
Detección y análisis de QTLs	132
<i>Análisis de un solo marcador</i>	132
<i>Análisis de mapeo por intervalos compuestos</i>	133
II.2.4. RESULTADOS	135
Caracterización fenotípica de los parentales, híbridos y poblaciones segregantes	135
Caracterización molecular	139
Extracción de ADN genómico	139
Búsqueda de polimorfismos en marcadores moleculares microsatélites, MM-SSR	139
QTLs: Método para su detección rápida: Análisis de Segregantes en Grupo	142
Detección y análisis de QTLs	144
<i>Análisis de un solo marcador</i>	144
<i>Análisis de mapeo por intervalos compuestos</i>	150
Asociación entre los caracteres forma de hoja y número promedio de semillas por vaina	156
II.2.5. DISCUSIÓN	158
II.2.6. CONCLUSIONES	167
CAPÍTULO III	
DISCUSIÓN GENERAL	168
Investigaciones y objetivos futuros	178
BIBLIOGRAFÍA	182
ANEXO	199

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A: azul.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AD: alta densidad.

ANVA: análisis de la variancia.

BD: baja densidad.

BSA: "Bulk Segregant Analysis". Análisis de segregantes en grupo.

cM: centimorgan.

D: densidad.

DAF: duración del área foliar.

DDE: días desde la emergencia.

g: gramos.

ERI: eficiencia de intercepción de la radiación.

FH: forma de hoja.

FNC: fotosíntesis neta del canopeo.

GLM: grupo de ligamiento molecular.

ha: hectárea.

h: hora.

IAF: índice de área foliar.

IAF: índice de área foliar crítico.

IC: Índice de cosecha.

ICLS: inicio del crecimiento lineal de la semilla.

IFH: índice de forma de hoja.

L: lanceolado.

LOD: \log_{10} "odds"

m: metro.

M: molar.

Mb: megabase.

min: minuto.

mA: miliampere.

mL: mililitro.

MM: marcadores moleculares.

nm: nanómetro.

ng: nanogramo.

NPSV: número promedio de semillas por vaina.

NPSV_D: número promedio de semillas desarrolladas por vaina.

NR: nudos reproductivos por unidad de superficie.

NSS: número de semillas por unidad de superficie.

NVS: número de vainas por unidad de superficie.

NT: nudos totales por unidad de superficie.

O: oblongo.

pb: pares de bases.

PCR: "Polymerase Chain Reaction". Reacción en cadena de la polimerasa.

PUS: peso unitario de las semillas.

QTL: "Quantitative Trait Loci". Loci de caracteres cuantitativos.

r: frecuencia de recombinación.

R: rojo.

RFA: radiación fotosintéticamente activa.

RI: radiación interceptada a nivel de suelo.

RI_M: radiación interceptada a la mitad de la altura del canopeo.

RIL: "Recombinant Inbred Lines". Líneas recombinantes endocriadas.

RL: rojo lejano.

SAM: selección asistida por marcadores.

SSR: "Simple Sequence Repeats". Repeticiones de Secuencia Simple.

t: tonelada.

TAN: tasa de asimilación neta.

TCC: tasa de crecimiento del cultivo.

TCS: tasa de crecimiento de las semillas.

VI: vainas iniciadas

µg: microgramo.

µL: microlitro.

µM: micromolar.

V: verde.

RESUMEN

“Aspectos ecofisiológicos y moleculares de la incorporación de las características hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja”

El rendimiento del cultivo de soja es función del número de semillas por unidad de superficie (NSS) y del peso unitario de las semillas. El componente más asociado con el rendimiento es el NSS, el cual depende a su vez del número de vainas por unidad de superficie y del número promedio de semillas por vaina (NPSV). Existen evidencias que sugieren que la radiación fotomorfogénica, especialmente la relación rojo/rojo lejano R/RL, participaría de la regulación del número de vainas en canopeos de soja. La radiación fotomorfogénica es muy afectada por cambios en la arquitectura del canopeo. La estructura de un canopeo puede modificarse por las prácticas de manejo o genéticamente a través de caracteres morfológicos como la forma de los folíolos. Canopeos de folíolos lanceolados permiten que la luz penetre hasta estratos más profundos en comparación con canopeos de folíolos oblongos. A su vez, genotipos con forma de hoja lanceolada tienden a tener mayor NPSV (debido a la presencia de una mayor frecuencia de vainas con cuatro semillas) en relación a genotipos con forma de hoja oblonga.

El objetivo de la presente Tesis fue estudiar aspectos ecofisiológicos y moleculares de la incorporación de las características hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja. En los experimentos ecofisiológicos se utilizaron pares de isolíneas que diferían en la morfología foliar y en el NPSV sembradas en dos densidades. Canopeos con hojas lanceoladas presentaron mayor relación R/RL en su interior en relación a canopeos con hojas oblongas. El número de vainas estuvo asociado en forma lineal y directa con la relación R/RL; no presentó asociación con la TCC_{R2-R5} , y mostró una relación inversa con el índice de área foliar y con el porcentaje de radiación interceptada. Estos resultados soportan la hipótesis de que la regulación del número de estructuras reproductivas en canopeos de soja responde a estímulos fotomorfogénicos. Por otra parte, incrementos en el porcentaje de vainas de cuatro semillas y por consiguiente, del NPSV aumentó en forma directa el NSS.

Para el estudio genético y molecular se obtuvieron poblaciones segregantes y líneas endocriadas recombinantes. Respecto del carácter forma de hoja lanceolada, se corroboró que el gen que regula dicha característica en los parentales utilizados es un alelo del gen *ln*, localizado en el grupo de ligamiento molecular (GLM) I de la soja. Además, se validaron y se

encontraron nuevos marcadores microsatélites estrechamente ligados a dicho gen en un contexto genético de buen comportamiento agronómico. Respecto del carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas, evaluado a través del NPSV, se identificaron cuatro QTLs estables, con efecto mayor que explican una alta proporción de la variabilidad fenotípica observada para dicho carácter en los GLM F, L e I. Los marcadores microsatélites ligados a hoja lanceolada y a alto porcentaje de vainas de cuatro semillas permitirán, en caso de ser validados, disponer de herramientas moleculares para facilitar la introgresión rápida de ambos caracteres a germoplasma elite de soja.

ABSTRACT

“Ecophysiological and molecular aspects of the incorporation of the traits narrow leaf and high percentage of four-seeded pods to soybean elite germplasm”

Soybean seed yield is function of seed number (per unit land area, SN) and seed size. Seed yield is highly associated with SN. SN is the result of pod number times seeds per pod (SPP). Evidences suggests that photomorphogenic radiation, especially red/far red (R/FR) ratio, could regulate the SN in soybean canopies. Photomorphogenic radiations are affected by changes in canopy structure. Canopy structure is modified by management practices or by morphological traits as leaflet shape. Lanceolate leaflet leaves genotypes (L) allowed better light penetration into deeper strata of the canopy compare to ovate leaflet leaves genotypes (O). Moreover, L tend to have more SPP than O, due to an increase in the four-seeded pods frequency.

The aim of this thesis was to study the ecophysiological and molecular features of introgressing the traits lanceolate leaflet and high number of four-seeded pods into soybean elite germplasm, and their contribution to crop improvement. For the ecophysiological study, the effect of different canopy structures on SN were evaluated using isolines differing in leaf shape (L and O) and seed per pod, sown in two densities. Results show that L canopies had higher R/FR ratio than O canopies. Moreover, a linear and direct association between R/FR ratio with the pod number was observed. On the contrary, no association of these components with CGR_{R2-R5} was found. These results support the hypothesis that the regulation of the pod number in soybean canopies respond to photomorphogenic stimuli. Also, increase in four-seeded pods directly improved SN.

Segregant populations and recombinant inbred lines (RILs) populations were used for the molecular approach. For the L parental genotypes, an *ln* gene allele, located in soybean molecular linkage group (MLG) I was verified as the gene that control the trait. Besides, new microsatellite markers tightly linked to the gene controlling this trait were found and validated in a genetic background of good agronomic performance. Regarding the four-seeded pods trait, four genomic regions (QTLs) that explained a high proportion of the phenotypic variance located in MLG F, L and I were identified. Molecular markers linked to lanceolate leaf shape and high four seed per pod frequency (high SPP) could be used as a tool to introgression both traits in soybean elite germoplasm.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Durante el desarrollo de esta Tesis se abordaron aspectos ecofisiológicos y moleculares de la incorporación de las características hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja. La tesis está estructurada en tres capítulos. En el primer capítulo se incluyen los aspectos ecofisiológicos, en el segundo los aspectos moleculares y en el tercero la discusión general. Debido al abordaje ecofisiológico y molecular de los caracteres bajo estudio se presentó una introducción, con los objetivos e hipótesis específicos para cada capítulo. A su vez, el capítulo II se dividió en dos secciones y se planteó una sola hipótesis que vincula ambas secciones.

En el Capítulo I se evaluaron los efectos de la incorporación del carácter hoja lanceolada sobre distintos parámetros de crecimiento como índice de área foliar, porcentaje de radiación interceptada, tasa de crecimiento del cultivo, entre otros. Además, se analizó el impacto de la incorporación de hojas lanceoladas sobre el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico dentro del canopy y su relación con la iniciación de vainas y con el componente del rendimiento número de vainas por unidad de superficie del cultivo. Además, se evaluó el efecto de incrementar el número promedio de semillas por vaina (a través del aumento en el porcentaje de vainas de cuatro semillas) y su contribución al componente del rendimiento número de semillas por unidad de superficie del cultivo.

El Capítulo II se subdividió en dos secciones. En la primera sección, se realizó la caracterización fenotípica del carácter forma de hoja a partir del estudio de una población segregante $F_{2:3}$. En la segunda sección el estudio se centró en el carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas evaluado a través del número promedio de semillas por vaina, utilizando poblaciones F_2 y líneas endocriadas recombinantes.

En el Capítulo III se realizó un análisis general de los resultados, tanto ecofisiológicos como moleculares, discutiendo la aceptación o rechazo de las hipótesis planteadas en función de los datos experimentales obtenidos. Se contrastó además la información generada en el marco de esta Tesis con los conocimientos previos existentes en la literatura sobre el tema. Finalmente se plantearon las perspectivas futuras y nuevas investigaciones a realizar a partir de los resultados presentados.

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

Generar información ecofisiológica y molecular de utilidad para la obtención de nuevos cultivares de soja con mayor potencial de rendimiento, obtenidos a través de la incorporación de las características hojas con folíolos lanceolados y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma elite de soja.

HIPÓTESIS GENERAL DE LA TESIS

La incorporación de las características hojas con folíolos lanceolados y alta proporción ($\geq 60\%$) de vainas de cuatro semillas en fondos genéticos apropiados (e.g. genotipos elite) permitirá la obtención de variedades de soja con mayor potencial productivo.

CAPÍTULO I:

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE LA INCORPORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS HOJA LANCEOLADA Y ALTO PORCENTAJE DE VAINAS DE CUATRO SEMILLAS A GERMOPLASMA ELITE DE SOJA

I.1. INTRODUCCIÓN

Soja: Orígenes e importancia en Argentina

La soja cultivada, [*Glycine max* (L.) Merr.], pertenece a la familia *Fabaceae* (sin. *Leguminosae*), subfamilia *Papilionoideae*, y al género *Glycine* (L.). Es nativa del este asiático, probablemente originaria de la región nororiental de China y procede de la especie silvestre *Glycine ussuriensis* Regal y Maack, una planta trepadora anual que crece en Corea, Taiwán, Japón, el norte de China y áreas adyacentes a Rusia. Actualmente, el género *Glycine* Willd. está dividido en dos subgéneros: *Glycine* y *Soja*. Dentro del subgénero *Soja* (Moench) F.J.Herm. se incluye a la soja cultivada *Glycine max* (L) Merril (Hymowitz y Singh, 1987).

En Argentina las primeras siembras de soja se realizaron hacia 1862, pero su cultivo masivo recién comenzó en la década de 1970, con un área sembrada de 660.000 hectáreas (ha) y 1.400.000 toneladas (t) producidas en la campaña 1976/77. La producción en Argentina durante los años siguientes y hasta la actualidad ha mostrado un desarrollo creciente y sostenido con 19.000.000 ha sembradas y 57.500.000 t producidas para la campaña 2016/17 (<https://datos.magyp.gob.ar>), lo que representa un aumento de 30 veces la cantidad de hectáreas sembradas respecto a la campaña 1976/77.

El importante crecimiento sostenido en la producción de soja en los últimos 40 años podría fundamentarse en diversas causas: el aumento de la superficie cultivada donde se cubrieron tanto tierras aptas como marginales, la incorporación de tecnologías adecuadas como la siembra directa, la utilización de genotipos adaptados a distintas regiones ecológicas, la aparición de los cultivos transgénicos y un mayor conocimiento de la fisiología del cultivo, fruto del esfuerzo constante en investigación y transferencia de resultados por parte del sector estatal y privado (Pascale y Demario, 1996; Gerster y Bacigaluppo, 2009).

Argentina ocupa el primer lugar como exportador mundial de harina y aceite de soja. Además ocupa el tercer lugar como productor y exportador mundial de grano de soja, luego

de Estados Unidos y Brasil. A esto se agregó en los últimos años la producción y exportación de biodiesel a base de aceite de soja, ocupando actualmente el tercer lugar como productor mundial (<https://www.usda.gov>). La cadena agro-industrial que la soja sustenta representa el 36 % de los empleos totales, el 45 % del valor agregado de los bienes de la economía y el 56 % de las exportaciones totales del País (ACSOJA, 2010).

Las Naciones Unidas proyectan que la población mundial superará los 9.000 millones de habitantes en 2050, incrementando la demanda mundial de alimentos en un 70 % (Tilman y Clark, 2015). La Argentina es uno de los pocos países con capacidad para satisfacer parte de esa demanda, siendo la soja su producto agrícola más importante. No obstante su producción no está exenta de problemas ambientales, especialmente los relacionados con el monocultivo y la presión sobre nuevas áreas. En este contexto, el desarrollo de variedades con características morfofisiológicas que permitan incrementar el potencial de rendimiento reduciendo el impacto ambiental es un objetivo prioritario en un esquema productivo sustentable.

Componentes del rendimiento en el cultivo de soja

En soja, como en todos los cultivos de granos, el rendimiento (R) se puede expresar en función de los componentes número de semillas por unidad de superficie del cultivo (NSS) y peso unitario de las semillas (PUS).

$$R = NSS \times PUS \qquad \text{Ecuación (1)}$$

De estos componentes, el más asociado con el R, es el NSS (Board y Modali, 2005; Calvino et al., 2003; Kokubun y Watanabe, 1983; Shibles et al., 1975). El NSS depende a su vez del número de vainas por unidad de superficie del cultivo (NVS) y del número promedio de semillas por vaina (NPSV).

$$NSS = NVS \times NPSV \qquad \text{Ecuación (2)}$$

Luego, combinando las ec. (1) y (2):

$$R = NVS \times NPSV \times PUS \qquad \text{Ecuación (3)}$$

El NVS se define durante el período comprendido entre el inicio de la floración y algunos días después del inicio del crecimiento de las semillas (estadios fenológicos R1 y R5, respectivamente, según la escala de Fehr y Caviness, 1977), por lo que este período es considerado como “crítico” en la determinación del rendimiento (Board y Tan, 1995). El NVS es función del número de nudos reproductivos por unidad de superficie (NR) y del número de vainas por nudo reproductivo. Mientras que el primer componente depende del porcentaje de nudos totales que se convierten en reproductivos; el segundo depende de la diferencia entre las vainas iniciadas y abscionadas por nudo reproductivo. A su vez, factores ambientales y de manejo afectan fuertemente al NVS (Board y Tan, 1995; Guamet y Nakayama, 1984; Jiang y Egli, 1993; Kantolic y Slafer, 2001).

Número promedio de semillas por vaina (NPSV)

A diferencia del NVS, el NPSV está menos sujeto a la influencia ambiental (*i.e.* es una característica propia del genotipo que se mantiene en distintos ambientes, Board y Harville, 1998; Egli, 1998; Shibles et al., 1975), ofreciendo así la oportunidad de manipularla genéticamente para mejorar uno de los componentes numéricos que determinan el potencial de rendimiento de una variedad.

Las variedades de soja cultivada pueden tener vainas con 1-, 2-, 3- y 4-semillas (excepcionalmente alguna con 5-semillas) (Figura 1).



Figura 1. Vainas con 1, 2, 3, 4 o 5 semillas (de izquierda a derecha), provenientes de materiales experimentales desarrollados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.

El NPSV se determina contando el número de vainas con 1 (loc1), 2 (loc2), 3 (loc3), 4 (loc4) y 5 (loc5) lóculos, presentes en cada planta y aplicando luego la siguiente ecuación:

$[(loc1 \times 1) + (loc2 \times 2) + (loc3 \times 3) + (loc4 \times 4) + (loc5 \times 5) / \text{número total de vainas}]$ (Quijano y Morandi, 2011). Así, el NPSV es un **promedio ponderado** que dependerá de la cantidad relativa de vainas de cada clase (*i.e.* con 1, 2, 3, 4 o 5 semillas) característica de cada genotipo. *Normalmente en los distintos cultivares se observa una mayoría de vainas de **dos clases consecutivas** (e.g. vainas con 2- y 3-semillas o vainas con 3- y 4-semillas).* En la medida en que se logre incrementar genéticamente el porcentaje de vainas con alto número de semillas (e.g. vainas con 4-semillas) respecto de las vainas con bajo número de semillas (e.g. vainas con 2-semillas) aumentará el componente NPSV de un determinado genotipo.

En la Figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, el NPSV de algunos cultivares comerciales de soja de distintos grupos de madurez (GM) y de una de las líneas desarrolladas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal. El NPSV de las variedades comerciales mostradas en la Figura 2 varía entre $2,2 \pm 0,01$ (A 5009) a $3,0 \pm 0,01$ (DM 3312). Esto indica que estas variedades poseen mayoritariamente vainas de 2- y de 3-semillas (en distintas proporciones).

Por otro lado, la línea experimental FV-481 presenta un $NPSV = 3,7 \pm 0,01$ (Figura 2), indicando que esta línea tiene vainas de 3- y 4-semillas. Cuando solo existen dos clases consecutivas, o cuando estas son ampliamente dominantes (como ocurre normalmente en las variedades cultivadas), la fracción decimal expresada en porcentaje (en este caso: $0,7 \times 100 = 70\%$) indica el porcentaje de vainas de la clase más alta (en este caso: 4-semillas) y el resto (en este caso: 30%) es el porcentaje de la clase inmediata más baja (en este caso: 3-semillas). O sea que la línea FV-481, cuyo $NPSV = 3,7$ tiene, en promedio, *70 % de vainas de 4-semillas y 30% de vainas de 3-semillas.*

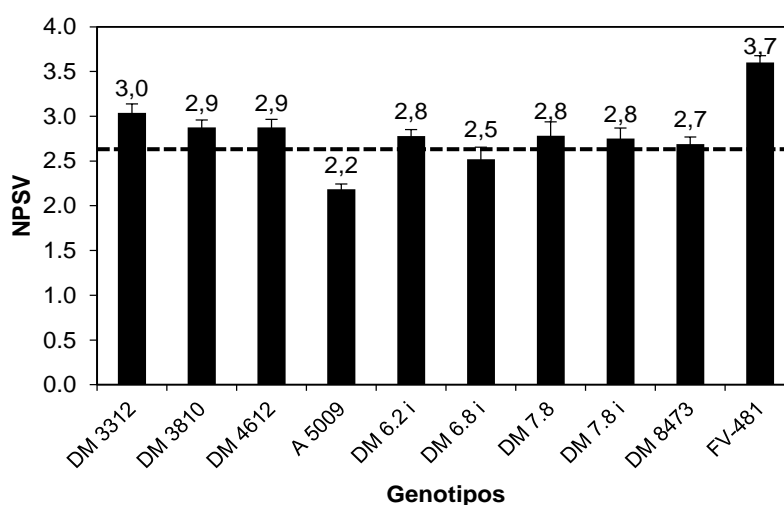


Figura 2. Número promedio de semillas por vaina (NPSV) de variedades comerciales de soja de distintos grupos de madurez y de la línea experimental FV-481, desarrollada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. DM y A: son materiales comerciales de los semilleros Don Mario y Nidera, respectivamente. Las líneas verticales que sobresalen de las barras indican el desvío de la media correspondiente a cada valor de NPSV. La línea cortada representa el promedio inter-varietal de las variedades comerciales mostradas en la Figura, siendo su valor igual a 2,7.

Referido a los porcentajes de vainas con “x” número de semillas por vaina, el NIAS Gene Bank (Japón) considera para soja las siguientes categorías: 1) Bajo: 30%; 2) Ligeramente bajo: 40%; 3) Intermedio: 50%; 4) Ligeramente alto: 60%; 5) Alto: 70% y 6) Muy alto: +70% (www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/eng/genresources/index.html).

Actualmente, el carácter alto porcentaje ($\geq 60\%$) de vainas de cuatro semillas no ha sido incorporado en las variedades comerciales presentes en el mercado Argentino.

Algunas de las probables causas podrían deberse a que la información disponible sobre sus potenciales ventajas es escasa y/o dispersa, a la falta de germoplasma competitivo con esta característica, a que los principales programas de mejoramiento no la han incluido entre sus prioridades, o a una combinación de estos u otros factores.

En este contexto es importante tener presente que, para que el aumento en la proporción de vainas con cuatro semillas logre incrementar el NPSV hasta niveles que puedan causar un impacto significativo en el rendimiento, a través de su aporte al componente NSS, otros componentes del rendimiento, como el NVS y el PUS, no deberían disminuir a niveles capaces de neutralizar el aumento en el NPSV. La discusión sobre el peso relativo de estos componentes en distintos escenarios será retomada más adelante, así como durante la discusión general de los resultados de esta Tesis.

Estructura del canopeo: su relación con la tasa de crecimiento del cultivo y la distribución espectral de la luz

Cambios en la arquitectura de las plantas tienen efectos significativos sobre la estructura del canopeo. Distintas prácticas de manejo (e.g. fecha de siembra, densidad, espaciamiento entre surcos, etc.), como así también las condiciones ambientales, pueden modificar la estructura del canopeo a través de variaciones en el índice de área foliar (IAF) (Wells et al., 1993).

Durante el desarrollo del cultivo, los cambios en el IAF no solo modifican el porcentaje de radiación fotosintéticamente activa (RFA) que intercepta el canopeo y la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), sino que además, las variaciones en el IAF modifican el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico dentro del canopeo. En ambos casos, son los fotoreceptores los que perciben las distintas señales lumínicas, generando cambios tanto cuantitativos como cualitativos.

Los cambios cuantitativos están asociados con la producción de asimilados, siendo los principales fotoreceptores involucrados en dicho proceso la Clorofila a y b. Los cambios cualitativos, asociados con respuestas fotomorfogénicas, están mediados por otros fotoreceptores como los fitocromos, criptocromos, fototropinas y el UVR8. Existen diversos procesos fisiológicos que están controlados por la radiación fotomorfogénica dentro de los que se incluyen la germinación de semillas (Baskin y Baskin, 1998; Casal y Sánchez, 1998); la elongación de los entrenudos y la producción de ramificaciones (Ballaré y Casal, 2000; Holmes y Smith, 1977) y la senescencia foliar (Rousseaux et al., 1996).

Las hojas absorben fuertemente la radiación en el rango del rojo (R, λ pico = 660 nm) y el azul (A, $400 \text{ nm} \geq \lambda \leq 500 \text{ nm}$), y transmiten y reflejan en una pequeña proporción en el rango del verde (V, $500 \text{ nm} \geq \lambda \leq 560 \text{ nm}$), y en mayor medida en el rango del rojo lejano (RL, λ pico = 730 nm). Por lo tanto, prácticas de manejo como aumentos en la densidad de siembra, causan no solo cambios en la cantidad de RFA recibida por las plantas, sino que además, generan cambios marcados en la distribución espectral de la luz, siendo el R y el A las longitudes de onda que rápidamente se absorben, en comparación con el RL (Casal y Smith, 1989). Estas reducciones en la cantidad de R, generan disminuciones en los valores de R/RL. Las plantas sensan estas condiciones de competencia y desencadenan una serie de respuestas que se conocen como de escape al sombreado (en inglés 'shade avoidance'), dentro de las que se encuentran la mayor elongación de los entrenudos, la floración anticipada, el incremento en la dominancia apical y la reducción del macollaje (Ballaré y Casal, 2000; Smith, 2000). En soja se ha observado que incrementos en la relación R/RL en

el interior de los canopeos generan aumentos en el número ramificaciones por planta y en la partición de materia seca a las mismas, al tiempo que disminuciones en dicha relación los reducen (Board, 2000; Green-Tracewicz et al., 2011; Kasperbauer, 1987).

Por otra parte, las plantas tienen la capacidad de sentir el ambiente en el que crecen, integrando la información que reciben y adaptándose a constantes cambios en las condiciones ambientales a través de la regulación de la relación fuente-destino. Ello les asegura una mayor flexibilidad y aumenta las probabilidades de supervivencia desde la germinación hasta la producción de semillas de la siguiente generación (Kasperbauer y Kaul, 1996).

Número de estructuras reproductivas en soja: su relación con la tasa de crecimiento del cultivo y la distribución espectral de la luz

El número de estructuras reproductivas en soja aumenta luego del estadio R1 y alcanza su máximo poco después de R5 (Egli et al., 1985b; Hansen y Shibles, 1978). Diversos factores han sido asociados con la generación de estructuras reproductivas en soja, tales como: el fotoperíodo (Guiamet y Nakayama, 1984; Kantolic y Slafer, 2001; Morandi et al., 1988), la temperatura (Gibson y Mullins, 1996; Molino, 2011), el estrés hídrico (Andriani et al., 1991), la disponibilidad de nitrógeno (Bredvan et al., 1978) y la radiación solar interceptada (Board y Tan, 1995; Jiang y Egli, 1995). La radiación interceptada es particularmente importante por su asociación directa con la fotosíntesis neta del canopeo (FNC). Muchos investigadores han estudiado la relación entre la FNC y el número de estructuras reproductivas en distintos momentos del desarrollo (Board y Tan, 1995; Egli, 2010; Egli y Zhen-wen, 1991; Jiang y Egli, 1995). En dichos experimentos se utilizó la TCC como estimador indirecto de la FNC. La TCC es función del IAF y de la tasa de asimilación neta (TAN). Shibles y Weber (1965) establecieron que cuando se alcanza un IAF suficiente como para interceptar el 95 % de la radiación incidente, la TCC alcanza niveles máximos.

A partir de los trabajos citados anteriormente se encontraron asociaciones lineales y directas entre el número de estructuras reproductivas y la TCC durante el período R2-R5 (TCC_{R2-R5}), sugiriendo que el número de semillas está determinado por la fotosíntesis del canopeo durante la floración y fijación de los frutos (Jiang y Egli, 1995). Esto ha llevado a considerar que el número de semillas en soja estaría limitado por la fuente (Egli, 1998). Board y Harville (1994) hallaron que el rango de respuesta del rendimiento ante cambios en la TCC, generados por modificaciones en la densidad de siembra o el espaciamiento entre

surcos era de 0 a 15 g.m⁻².d⁻¹; logrando con éste último valor los niveles máximos en el número de semillas. Sin embargo, Quijano et al. (1998), observaron que si bien la relación lineal y directa entre la TCC_{R2-R5} y el número de semillas se manifestaba para un rango de TCC de 7,9 a 13,5 g.m⁻².d⁻¹, con TCC de 13,8 a 19,7 g.m⁻².d⁻¹ (diferentes entre sí, $P < 0,05$) el número de semillas se mantenía constante, sugiriendo la posibilidad de que otro/s factor/es podrían estar regulando el número de estructuras reproductivas en canopeos de soja en esas condiciones. Similares resultados fueron observados por Wells et al. (1993), quienes evaluaron los efectos de cambios en la morfología foliar y de los tallos sobre la interceptación de la radiación y el crecimiento. En dicho estudio los autores encontraron que en determinados ambientes, genotipos que interceptaban el 95 % de la radiación incidente y que por lo tanto maximizaban la TCC, presentaban diferencias significativas en rendimiento. Con lo cual concluyeron que otros factores además de la interceptación de la radiación y la TCC estarían limitando el rendimiento en soja.

Quijano y Morandi (2011) modificaron la estructura del canopeo de soja utilizando defoliaciones parciales aplicadas a partir de la floración. A pesar de que las defoliaciones redujeron significativamente el IAF y el porcentaje de radiación interceptada, el número de vainas iniciadas aumentó. Lo más notable de éste trabajo fue que el número de vainas iniciadas aumentó a medida que IAF disminuyó, siendo esta relación válida tanto para IAF mayores como menores al IAF crítico. Además, el número de vainas iniciadas no estuvo asociado ni con la interceptación de la radiación ni con la TCC. A partir de estos resultados los autores sugirieron que el cambio en el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico, generado por la remoción de los folíolos, regularía el número de vainas iniciadas, introduciendo el concepto de que, en canopeos de soja, el número de vainas iniciadas estaría controlado fotomorfogénicamente.

Pocos estudios han considerado los efectos de las señales fotomorfogénicas en la determinación de los patrones de formación de estructuras reproductivas en soja. Heindl y Brun (1983), realizaron experimentos de suplementación lumínica utilizando luz roja y luz blanca aplicadas en el estrato inferior de canopeos de soja. Además, cubrieron con papel aluminio parte de las flores y pequeñas vainas, con el objetivo de analizar los efectos de dichas prácticas sobre la abscisión de las mismas. En dichos experimentos, los autores observaron que la suplementación lumínica tanto con luz roja como con luz blanca fue similar y tendían a reducir la abscisión e incrementar el peso de las semillas por nudo, comparado con la luz natural, descartando que dicha respuesta estuviese relacionada con la fotosíntesis. Un efecto contrario se produjo cuando las flores y las vainas fueron sombreadas. Por otro lado, el sombreado de flores y de vainas redujo en un 30 % la

acumulación de ^{14}C en dichos órganos. Así, los autores concluyeron que la luz percibida por las flores y pequeñas vainas regularía tanto su abscisión, como así también, su capacidad de acumular fotoasimilados.

Myers et al. (1987), estudiaron el rol de la luz en la abscisión de estructuras reproductivas en condiciones controladas. Los autores observaron que las flores que recibieron luz suplementaria (luz roja o luz blanca) se transformaron en destinos más intensos, incrementando la translocación de sacarosa hacia las estructuras reproductivas. Además, la suplementación lumínica permitió que se fijaran un mayor número de vainas respecto del control. Los autores concluyeron que la abscisión de las estructuras reproductivas en soja es una respuesta fotomorfogénica percibida en los racimos de las plantas. Además sugirieron que el fotorreceptor que regularía la abscisión y la acumulación de sacarosa podría ser el fitocromo.

Kasperbauer (1987) evaluó plantas de soja expuestas a pulsos de 5 minutos de rojo, rojo lejano o rojo lejano + rojo al final de un período fotosintético de 12 horas, durante 20 días consecutivos, a partir del estadio V1 en condiciones controladas. El autor observó que las plantas que recibieron luz roja al final del día iniciaron un mayor número de ramificaciones. Por otro lado, en ensayos de campo, evaluó el efecto de distintos espaciamientos entre surcos sobre la altura de plantas, número de nudos en el tallo principal, número de ramificaciones y la partición a tallos, ramificaciones y raíces. Plantas que fueron sembradas con el mayor espaciamiento entre surcos (100 cm) mostraron: mayor número de ramificaciones por planta, menor altura y particionaron más asimilados a raíz y ramificaciones respecto del tallo principal. Además, se mantuvo constante el número de nudos del tallo principal entre los distintos espaciamientos analizados. El autor sugirió que dichas diferencias estuvieron asociadas a variaciones en la relación R/RL percibida durante el desarrollo del cultivo. Relacionado con este trabajo, Board (2000), utilizando un cultivar de soja de crecimiento determinado (Deltapine 3606, GM VI), analizó como cambios en la TAN y en el IAF contribuyeron al equilibrio en la TCC en diferentes densidades de siembra. En dicho trabajo, la densidad de siembra no afectó el rendimiento, ya que, en bajas densidades se generó una mayor TAN que permitió equilibrar la TCC; no encontrándose variaciones en el número de vainas al final de la estación de crecimiento. Además, en baja densidad, se registró una mayor partición de materia seca a ramificaciones, probablemente inducido por una mayor relación R/RL dentro del canopeo.

Los trabajos citados anteriormente focalizaron el estudio en el rol de las señales fotomorfogénicas sobre la partición de asimilados y/o la abscisión de estructuras reproductivas, sin considerar el posible rol de dichas señales sobre la iniciación de vainas.

Las primeras evidencias relacionadas con éste último punto fueron informadas por Quijano y Morandi (2011) y Quijano (2015). Sus resultados mostraron que defoliaciones a partir de floración, que generaban distintos grados de apertura del canopeo, aumentaba el número de vainas iniciadas. El incremento en el número de vainas iniciadas estuvo asociado con un aumento en los nudos de las ramificaciones, sin modificaciones en los nudos del tallo principal. Como se citara anteriormente, en esos trabajos, lo más notable fue la relación inversa entre el número de vainas iniciadas y el IAF (tanto por encima como por debajo del IAF crítico) y la no relación entre el número de vainas iniciadas y la TCC_{R2-R5} . En base a lo expuesto, los autores sugirieron que las variaciones en el número de vainas iniciadas, como en el número de nudos de las ramificaciones, podrían haber estado relacionados con un incremento en la relación R/RL en el interior del canopeo, producto de las defoliaciones realizadas durante el desarrollo del cultivo. Relacionado con estos trabajos, algunos estudios han demostrado, que pequeñas reducciones en el IAF, producto de defoliaciones o condiciones ambientales adversas, no afectan el rendimiento de los cultivos o lo hacen en menor medida (Conley et al., 2008, 2009; Haile et al., 1998).

En este contexto, es interesante mencionar un trabajo reciente de Srinivasan et al. (2017). Estos autores modificaron las concentraciones de CO_2 ($[CO_2]$) a cielo abierto, en las instalaciones SoyFACE (del inglés "Soybean Free Air Concentration Enrichment Facility") y señalaron que el índice de área foliar de los cultivares modernos de soja es supra-óptimo, sugiriendo que la disminución, y no el incremento, del área foliar es lo que contribuirá al aumento de los rendimientos, tanto para las $[CO_2]$ actuales como para $[CO_2]$ más elevadas, como las esperadas debido al cambio atmosférico global (Srinivasan et al., 2017).

Los resultados discutidos en los párrafos anteriores no solo indican que el número de vainas iniciadas en soja podría estar regulado fotomorfogénicamente, sino que además sugieren que en algunas circunstancias el exceso de IAF podría incluso generar un impacto negativo sobre algunos componentes del rendimiento potencial del cultivo.

Morfología Foliar: su relación con la estructura del canopeo y con los componentes del rendimiento.

Si bien la estructura de un canopeo está influenciada por las condiciones ambientales y de manejo, como la densidad de siembra, fecha de siembra, espaciamiento entre surcos, entre otras, la misma puede alterarse genéticamente de manera sustancial, modificando diversos caracteres morfológicos como el número y la forma de los folíolos, el

hábito de crecimiento, la longitud de los entrenudos, entre otros (Haile et al., 1998; Wells et al., 1993).

Relacionado con la forma de los folíolos, en sojas silvestres (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) se identificaron cinco categorías diferentes de morfología foliar: ovales, aovadas, lanceoladas, lineales y ultralineales (Chen y Nelson, 2004). En cambio, en sojas cultivadas (*Glycine max*), la forma de los folíolos se clasifica mayoritariamente en dos categorías principales: oblonga (también denominada 'hoja ancha') y lanceolada (también denominada 'hoja angosta'). La mayoría de los cultivares comerciales de soja presentan hojas con folíolos oblongos (Dinkins et al., 2002) (Figura 3).



Figura 3. Fotos de un folíolo y una hoja lanceolada (izquierda) y de un folíolo y una hoja oblonga (derecha), obtenidos de líneas desarrolladas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.

La morfología foliar de las variedades de soja cultivada está controlada por un gen simple (Ln/l_n), cuyo alelo dominante ($Ln/-$) determina hoja con folíolos oblongos, mientras que ambos alelos recesivos (l_n/l_n) son necesarios para obtener hojas con folíolos lanceolados.

Canopeos con hojas con folíolos lanceolados reducen el área foliar aproximadamente un 30%, respecto de su contraparte oblonga, sin afectar el rendimiento final (Hicks et al., 1969; Hiebsch et al., 1976; Mandl y Buss, 1981). Una de las ventajas que se le han atribuido a genotipos con hojas con folíolos lanceolados es la mejor penetración de la luz en el canopeo, permitiendo que hojas de estratos inferiores contribuyan en mayor proporción a la fotosíntesis total del canopeo (Hicks et al., 1969; Suh-Sugkee et al., 2000; Wells et al., 1993).

Egli et al. (1970) observaron que la tasa fotosintética por unidad de área foliar fue un 25 % mayor para isólinas del cultivar Harosoy con folíolos lanceolados respecto de las líneas con folíolos oblongos. Ellos sugirieron que la mayor fotosíntesis por unidad de área

foliar se podía deber a dos factores: 1) una mejor distribución de la luz en el canopeo, y 2) una mayor proporción de hojas que participaron en la fotosíntesis total. A pesar del incremento de la fotosíntesis por unidad de área foliar en canopeos con folíolos lanceolados, cuando dicho parámetro fue expresado por unidad de área de suelo, no se detectaron diferencias entre los distintos genotipos, debido a que la línea con folíolos lanceolados presentó un 30 % menos de área foliar que su contraparte oblonga. Similares resultados fueron obtenidos por Hiebsch et al. (1976) y Rotzler et al. (2009). Por otro lado, Sung y Chen (1989) informaron que los mayores valores de fotosíntesis aparente por unidad de área foliar en isolíneas del cultivar Clark con hojas con folíolos lanceolados, se debieron a una mayor cantidad y actividad de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y a un mayor número de cloroplastos por unidad de área foliar. Además sugirieron que la mejora en la capacidad fotosintética de las hojas de las líneas lanceoladas fue independiente de la posición en la planta.

En ninguno de los trabajos citados anteriormente los autores evaluaron el efecto que podría generar la incorporación de la característica hoja con folíolos lanceolados sobre la eficiencia en la intercepción de la RFA por unidad de área foliar (ERI). En relación a esto último Board (2000) sugirió que los mayores valores de TAN observados para el cultivar Deltapine 3606 perteneciente al GM VI y de hábito de crecimiento determinado sembrado en baja densidad, estuvieron asociados a una mayor ERI en relación a la alta densidad. Esa mayor ERI observada en baja densidad estuvo relacionada con una distribución más equidistante de las plantas en dicha densidad que a su vez permitió disminuir el sombreado entre las mismas previo al cierre del canopeo. Tomando en consideración las observaciones de Board (2000) cabría preguntarse si la reducción del área foliar en canopeos lanceolados respecto de canopeos oblongos podría mejorar la eficiencia en la captación de la RFA en los primeros respecto de los segundos.

Por otro lado, Metz et al. (1984) sugirieron que plantas con folíolos más pequeños, que originan canopeos más abiertos, se adaptan mejor al acortamiento entre hileras. Con lo cual, a partir de los resultados citados anteriormente, podría pensarse que plantas con folíolos lanceolados podrían adaptarse a rangos más amplios de densidad y/o distancia entre hileras, flexibilizando las alternativas de manejo del cultivo.

También se informó que isolíneas con folíolos lanceolados toleran mejor la defoliación que su contraparte con folíolos oblongos, alcanzando rendimientos iguales o mayores con niveles similares de defoliación, sugiriendo un mejor comportamiento frente a insectos defoliadores (Haile et al., 1998). A su vez, canopeos más abiertos y ventilados son menos propensos a la creación de microclimas favorables para el desarrollo de

enfermedades foliares que requieren alta humedad relativa para su desarrollo o períodos prolongados de mojado foliar (e.g. roya de la soja que requiere un mínimo de seis horas de rocío o mojado foliar para la germinación de sus esporas, Marchetti et al., 1976; Melching et al., 1989).

A pesar de las potenciales ventajas descritas anteriormente, las investigaciones realizadas inicialmente no mostraron diferencias de rendimiento entre genotipos con folíolos lanceolados y oblongos, llevando a suponer que la incorporación del carácter hoja lanceolada no implicaría ni una ventaja ni una desventaja para el cultivo de soja (Hartwig y Edwards, 1970; Hicks et al., 1969; Hiebsch et al., 1976; Jain y Singh, 1978; Mandl y Buss, 1981; Rotzler et al., 2009; Wells, et al., 1993).

Sin embargo, la información antes mencionada fue obtenida para genotipos antiguos que ya no son competitivos comercialmente. Por lo tanto, considerando que: 1) el progreso en la ganancia genética para rendimiento ocurrido en las últimas décadas ha sido de 43 kg.ha⁻¹ año⁻¹ (De Felipe et al., 2016); y 2) el impacto de la incorporación de la característica hoja lanceolada depende del fondo genético en el que la misma se expresa Cooper (1975), se consideró importante investigar el impacto de la incorporación de la característica hojas con folíolos lanceolados en germoplasma moderno de soja.

Como se mencionó anteriormente la apertura del canopeo no solo facilita la llegada de mayor cantidad de radiación fotosintética a las hojas de los estratos inferiores, sino que además, modifica cualitativamente el ambiente lumínico del mismo, a través de cambios en el balance entre longitudes de onda con efecto fotomorfogénico, entre las que se destacan el R y el RL, percibidas a través del pigmento fitocromo (Smith, 1986). Además, cambios en la relación R/RL que perciben las plantas tienen profundos efectos sobre su desarrollo (Ballaré y Casal, 2000). Por lo tanto, considerando que la arquitectura de los canopeos de plantas con folíolos lanceolados difiere de los de su contraparte oblonga, es posible que el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico dentro del canopeo sea diferente también entre las distintas morfologías foliares.

No obstante, hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la forma de los folíolos sobre el balance de las longitudes de onda con efecto fotomorfogénico y su posible relación con la iniciación de vainas y el rendimiento.

Por otro lado, en los estudios realizados hasta el momento (citados anteriormente) los genotipos lanceolados alcanzaron rendimientos similares a los genotipos oblongos con menor índice área foliar, lo que también sugiere diferencias en la relación fuente-destino entre ambas morfologías foliares.

Además, relacionado con la morfología foliar, diversos autores han observado que genotipos con hojas lanceoladas tienden a tener mayor NPSV que su contraparte oblonga (Dinkins et al., 2002; Domingo, 1945; Takahashi, 1934; You et al., 1995). La causa de dicha asociación ha sido atribuida a factores diferentes, por un lado, algunos autores consideran que esta asociación se debe a un efecto pleiotrópico del gen que determina la forma de hoja lanceolada sobre el NPSV (Dinkins et al., 2002; Jeong et al., 2011, 2012, Johnson y Bernard, 1962; Weiss, 1970), mientras que otros autores postulan que se trataría de un fenómeno de ligamiento entre ambos caracteres (Domingo, 1945; Takahashi, 1934 y Zhu y Sun, 2006).

Independientemente de las causas que determinan dicha asociación, en algunos casos se ha observado que, incrementos en el NPSV en los genotipos lanceolados estuvieron asociados con disminuciones en el número de vainas por planta (Hicks et al., 1969) y en otros, con reducciones en el peso unitario de semillas (Dinkins et al., 2002; Mandl y Buss, 1980). Algunos autores han relacionado estos resultados con un fenómeno de compensación que ocurriría en soja, llegándose a sugerir que como consecuencia de esa compensación, el aumento del rendimiento en soja ha sido relativamente pequeño comparado con el de otros cultivos (Pedersen y Lauer, 2004).

Sin embargo, recientemente se ha informado que la ganancia genética promedio para cultivares de los grupos de madurez III, IV y V, liberados comercialmente en Argentina entre 1980 y 2015 fue de $43 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$, lo que equivale a una ganancia relativa de $1,1 \text{ \%} \cdot \text{año}^{-1}$ (De Felipe et al., 2016). En dicho trabajo, el aumento en el número de semillas explicó más del 60 % del aumento en el rendimiento mientras que no se registró asociación entre el rendimiento y el peso unitario de las semillas (De Felipe et al., 2016). De estos resultados se puede inferir que las variaciones en el peso individual de las semillas no afectaron el aumento en el rendimiento asociado al aumento en el número de semillas.

En este contexto es interesante mencionar que Gnan et al. (2014), trabajando con un conjunto de líneas avanzadas de *Arabidopsis thaliana*, derivadas de intercruzas multiparentales, encontraron que tanto el peso como el número de las semillas eran influenciados por un elevado número de QTLs no superpuestos; sugiriendo que ambos caracteres evolucionaron independientemente. Estos autores concluyeron que la compensación (“trade-off”) entre peso y número de semillas tendría un rol menor en la explicación de la variación fenotípica de estos componentes.

Tomados en conjunto, estos resultados indicarían, que si bien es esperable que en condiciones de cultivo se produzcan distintos grados de compensación entre componentes del rendimiento, dichas compensaciones no necesariamente se neutralizan mutuamente, y

la mejora en el rendimiento va a depender de como se combinen los distintos componentes que lo conforman y del peso relativo de los efectos ambientales y genéticos sobre cada uno de ellos.

Considerando los antecedentes expuestos, este Capítulo estará orientado principalmente a evaluar el efecto de cambios en la morfología foliar sobre la radiación fotomorfogénica (en particular la relación R/RL) en el interior del canopeo y su posible asociación con el componente número de vainas iniciadas y finales y el efecto de incrementar genéticamente el NPSV sobre el NVS y el NSS.

I.2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

Objetivos Ecofisiológicos Específicos

1. Cuantificar el impacto de la incorporación de la característica hoja con folíolos lanceolados sobre la eficiencia de intercepción de la radiación fotosintética.
2. Evaluar el efecto de la incorporación de hojas con folíolos lanceolados sobre el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico y su asociación con el número de vainas iniciadas en canopeos de soja.
3. Cuantificar el impacto de aumentar la proporción de vainas de cuatro semillas sobre el número de semillas a cosecha.
4. Evaluar el impacto de la incorporación de hojas con folíolos lanceolados y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas sobre componentes del rendimiento en genotipos modernos de soja.

Hipótesis Ecofisiológicas Específicas (H)

H1. Canopeos de plantas con hojas con folíolos lanceolados mejoran la intercepción de la radiación por unidad de área foliar respecto de su contraparte con folíolos oblongos.

H2. Canopeos de plantas con hojas con folíolos lanceolados aumentan la relación R/RL en su interior respecto de su contraparte con folíolos oblongos y este aumento está directamente asociado con el número de vainas iniciadas.

H3. El aporte del aumento del número de semillas por vaina al incremento del número de semillas totales es independiente del número de vainas.

I.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La totalidad de los experimentos desarrollados en este trabajo de Tesis y detallados en los capítulos siguientes, se llevaron a cabo en los laboratorios, invernáculos y sector de campo asignados a la Cátedra de Fisiología Vegetal, ubicados en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, en la localidad de Zavalla, Argentina (33°01' S, 60°52' O).

Para los ensayos ecofisiológicos, se utilizaron dos pares de *líneas cuasi-isogénicas* (que de aquí en adelante se denominarán "*líneas*" por simplicidad) que diferían en la forma de hoja (FH) y en el NPSV, obtenidas en el laboratorio de Fisiología Vegetal. La metodología utilizada para la obtención de las mismas fue la selección repetitiva de heterocigotas, utilizando como carácter de selección la forma de los folíolos (Mandl y Buss, 1980; Ray et al., 1995).

La obtención de estas líneas se realizó a partir del cruzamiento entre un genotipo con folíolos lanceolados (L) y alto NPSV y un genotipo con folíolos oblongos (O) y bajo NPSV (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los parentales utilizados en la obtención de las poblaciones de las cuales se derivaron las líneas utilizadas en los ensayos ecofisiológicos.

Forma de hoja	NPSV ¹	Grupo de madurez	Hábito de Crecimiento	Color de Flor	Pubescencia
Lanceolada	3,4	V	Semideterminado	Púrpura	Leonada
Oblonga	2,4	V	Indeterminado	Blanco	Gris

¹ NPSV: número promedio de semillas por vaina.

Los cruzamientos se hicieron utilizando la línea L como progenitor femenino y la O como progenitor masculino. Como la característica hoja lanceolada es recesiva, las plantas F₁ con hojas lanceoladas se eliminaron por provenir de hibridaciones fallidas (autofecundaciones) y solo se cosecharon las oblongas que provenían de hibridaciones (F₁) efectivas. En la generación F₂ las plantas con hojas lanceoladas fueron eliminadas y las oblongas (que podían ser tanto homocigotas como heterocigotas) fueron propagadas en surcos de progenie en la generación F_{2,3}. A partir de aquí, se seleccionaron repetidamente las plantas heterocigotas (plantas con folíolos oblongos provenientes de surcos segregantes

para forma de hoja) hasta obtener semilla de la generación F₆. En la generación F_{6.7} se establecieron los distintos pares de líneas, una con hoja oblonga y la otra con hoja lanceolada. En la generación F₈, se evaluó la homocigosis de las plantas selectas y se incrementó el número de semillas. De ésta manera, cada par de líneas L y O derivó de una misma semilla heterocigota F₆. Las líneas así obtenidas tienen aproximadamente el 97% de sus genes en común y pueden ser empleadas para su caracterización fisiológica.

Al final de éste proceso se obtuvieron una totalidad de 43 pares de líneas L y O. Las mismas se sembraron a campo el 28 de diciembre de 2012, en surcos de dos metros (m) de largo, separadas a 0,52 m. Durante la estación de crecimiento se constató que las líneas de cada par fueran homogéneas para los caracteres color de flor, pubescencia, color de vaina, altura, hábito de crecimiento, días a floración y a madurez. La cosecha de las líneas tuvo lugar el 09 de mayo de 2013. Luego de la cosecha, las plantas fueron procesadas evaluando el NPSV. Finalmente, se seleccionaron dos pares de líneas L y O para los ensayos ecofisiológicos.

Tabla 2. Características de los pares de líneas seleccionadas para los ensayos ecofisiológicos.

Líneas	Forma de hoja	Color de Flor	Hábito de Crecimiento	Grupo de madurez	Pubescencia	NPSV ¹	
PAR 1	FV-9L	Lanceolada	Púrpura	Indeterminado	V	Leonada	3,6
	FV-9O	Oblonga	Púrpura	Indeterminado	V	Leonada	3,0
PAR 2	FV-15L	Lanceolada	Blanca	Indeterminado	V	Leonada	3,6
	FV-15O	Oblonga	Blanca	Indeterminado	V	Leonada	3,0

¹ NPSV: número promedio de semillas por vaina.

Diseño Experimental

Los experimentos a campo fueron conducidos durante las campañas 2013/14 (Exp.13/14) y 2014/15 (Exp. 14/15), en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias. Para ambos experimentos se utilizó un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones. En el Exp.13/14 los dos pares de líneas se sembraron en parcelas de cuatro surcos de seis m de largo, distanciados a 0,52 m y dos densidades (D): 16 plantas.m⁻² (baja densidad, BD) y 30 plantas.m⁻² (alta densidad, AD). En el Exp. 14/15 se sembraron los mismos pares de líneas, en parcelas de cinco surcos de ocho m de largo, distanciados a 0,52 m. Las densidades de siembra fueron: 14 plantas.m⁻² (BD) y 28 plantas.m⁻² (AD). Las parcelas fueron sembradas al doble de la densidad y entre los estadios V2 y V3 (dos y tres

hojas totalmente expandidas, respectivamente) (Fehr y Caviness 1977), fueron raleadas a la densidad objetivo. Se utilizó riego suplementario para evitar el déficit hídrico y se controlaron los insectos, enfermedades y malezas durante todo el ciclo del cultivo. Para cada estación de crecimiento se registró la temperatura media ($^{\circ}\text{C}$), la radiación ($\text{Rad: MJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$) y las precipitaciones (mm) (Anexo, Figura suplementaria 1).

Las fechas de emergencia para las dos campañas analizadas fueron: 28 de Diciembre para el Exp. 13/14 y 24 de Diciembre para el Exp. 14/15.

Mediciones de radiación fotosintética y fotomorfogénica y parámetros de crecimiento

Para la medición de los distintos estadios fenológicos se utilizó la escala de Fehr y Caviness (1977). Los estadios V5 (quinta hoja totalmente expandida), R2 (plena floración), R5 (inicio crecimiento de semilla), R6 (semilla completamente desarrollada) y R8 (plena madurez) se alcanzaron a los 26, 47, 73, 97 y 124 días desde la emergencia (DDE), respectivamente, para ambos pares de líneas, en el Exp. 13/14; y V7 (séptima hoja totalmente expandida), V13 (décimo tercer hoja totalmente expandida), R2, R5, R6 y R8 se alcanzaron a los 28, 42, 49, 76, 103 y 124 DDE, respectivamente, en el Exp. 14/15.

En los distintos estadios fenológicos mencionados se realizaron muestreos destructivos de $0,5\text{ m}^2$, excepto para el muestreo correspondiente al estadio R8, en el que la superficie cosechada fue de 1 m^2 . Para cada muestreo las plantas fueron separadas en tallos, ramificaciones, pecíolos, folíolos, vainas (adicionalmente separadas en carpelos y semillas, para el posterior cálculo de las tasas de crecimiento de las semillas). En el estadio R5 se contaron: nudos del tallo principal. m^{-2} , nudos reproductivos del tallo principal. m^{-2} , vainas del tallo principal. m^{-2} , número de ramificaciones. m^{-2} , nudos de las ramificaciones. m^{-2} , nudos reproductivos de las ramificaciones. m^{-2} , vainas de las ramificaciones. m^{-2} , vainas. m^{-2} , granos. m^{-2} . Las vainas totales por m^{-2} , presentes en el estadio R5, cuyo tamaño fuera $\geq 2\text{ mm}$ se consideraron como vainas iniciadas (VI) (Quijano, 2014). Los muestreos fueron llevados a estufa ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) para su secado hasta alcanzar un peso constante.

El IAF fue medido utilizando un medidor de área foliar: LI-3100 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). La duración de área foliar (DAF) se determinó a través del cálculo del área bajo la curva, utilizando la regla del trapecio, ya que es una forma de aproximar a una integral definida.

Se midió la interceptación de radiación fotosintéticamente activa (RFA), con un sensor de línea LI-COR Line Quantum conectado a un registrador de datos LI-COR modelo LI-

1000. El porcentaje de radiación interceptada a nivel de suelo (RI, %) fue determinada en cada parcela a partir de medidas obtenidas sobre el canopeo y a nivel del suelo. El sensor lineal fue colocado en diagonal a los surcos de siembra, tomando los tres surcos centrales de cada parcela. Las mediciones fueron realizadas en días soleados, entre las 11:30 y las 14:00 horas. En cada parcela se realizaron dos mediciones en ubicaciones elegidas al azar. La RI fue medida a los 26, 39, 47, 54, 62, 69 DDE en el Exp. 13/14, y a los 28, 32, 39, 48, 56, 64 DDE en el Exp. 14/15. La eficiencia de intercepción de la radiación (ERI, %) se estimó usando la relación RI/IAF.

En el Exp. 14/15 se instaló un equipo, previamente desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, en colaboración con la Empresa Consultar SRL, que permitió medir RFA (rango: 400-700 nm), R (650-670 nm) y RL (720-740 nm) (Anexo, Figura suplementaria 2). Este equipo utiliza fotodiodos (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan) conectados a un dispositivo (SAD 9000 PLT) que recibe las señales y registra el valor medido. Los fotodiodos utilizados para medir R y RL fueron cubiertos con acetatos específicos para restringir el pico de sensibilidad a la longitud de onda deseada. Los fotodiodos utilizados fueron: G1115 cubierto con acetato LEE 106 (rojo primario) para medir R, G1735 cubierto con acetato LEE 118 (azul claro) y LEE 021 (ámbar dorado) para medir RL y G2711-01 para medir RFA. Todos los fotodiodos estaban colocados sobre un disco de 2 cm de diámetro cubierto con una semiesfera de acrílico blanco cuya función era de corrector de coseno. El conjunto de fotodiodos R, RL y RFA constituía un sensor. Los valores de cada sensor se ajustaron mediante curvas de calibración obtenidas a partir de medidas realizadas con un espectro-radiómetro LI-COR LI-1800, conectado a un sensor de coseno remoto. Las mediciones se registraron cada 30 minutos desde el amanecer hasta el atardecer. Los ocho sensores disponibles fueron colocados en el par de líneas FV-15. Cuatro sensores se colocaron en la línea FV-15L y los otros cuatro en la línea FV-15O. Para cada línea, se destinaron dos sensores para BD y dos para AD. Cada par de sensores se ubicaron entre dos plantas consecutivas de un mismo surco (intrasurco), y en la mitad del espacio entre dos surcos consecutivos (entresurco), ambos posicionados a la mitad de la altura de canopeo. Los sensores se fueron desplazando hacia arriba a medida que se avanzó en el ciclo del cultivo, para que permanecieran siempre en la posición media relativa a la altura de las plantas. Los valores de R/RL y RFA diarios para cada línea sembrada en BD y en AD, son el resultado del promedio de las mediciones de los sensores ubicados en el entresurco y en el intrasurco entre las 10 am y 17 pm. Solo se consideraron las medidas tomadas en días soleados. Las medidas en los horarios y días indicados fueron elegidas porque son las condiciones que generan mediciones sin errores o datos fuera de rango. Se

calculó un valor promedio de la calidad del ambiente lumínico de cada línea considerando el período de V7 a R5. Para las líneas FV-9L y FV-9O, sembradas en BD y AD, se estimó un valor de R/RL para el período comprendido desde V7 hasta R5, utilizando funciones de regresión que relacionaban la relación R/RL con el IAF. El coeficiente de determinación (R^2) para esas funciones fue de 99 %. La evolución de la relación R/RL se ajustó a una función utilizando el programa TBL Curve V 2.0 (Jandel Scientific, 1991). La comparación de los valores en V7, R2 y R5 se realizó mediante la prueba t de *Student* (Snedecor, 1964) utilizando el valor ajustado de la función y sus errores estándar.

El período comprendido entre R2 y R5 fue considerado como el período de crecimiento de las vainas, mientras que el período comprendido entre R5 y madurez fisiológica (R7) fue considerado como el período de crecimiento de las semillas.

Las TCC ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}_{\text{suelo}}\cdot\text{d}^{-1}$) y las TAN ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}_{\text{hoja}}\cdot\text{d}^{-1}$) para los distintos períodos analizados se estimaron como la pendiente de la regresión entre el peso seco total y el tiempo (DDE) utilizando un programa de regresión (Hunt y Parsons, 1981). Para cada ecuación de regresión se analizó sucesivamente la significancia del ajuste lineal, cuadrático y cúbico, y el mismo fue incluido si reducía significativamente la suma de cuadrados del residual ($P < 0,01$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los índices se determinaron con la prueba t de *Student* (Snedecor, 1964), utilizando los errores estándar calculados por el programa de regresión.

La relación destino-fuente durante el período de formación de vainas (R2-R5) se calculó como el cociente entre el número de vainas en R5 y el IAF promedio para dicho período. Además, en R5 se calculó la partición de materia seca a los distintos órganos de la planta (folíolos, pecíolos, tallos, ramificaciones y vainas) como el cociente entre el peso seco total de cada órgano y el peso seco de la biomasa aérea total. Para el cálculo de partición, el peso de las hojas caídas en dicho estadio no fue incluido.

A la madurez se cosechó 1 m^2 de área cortando las plantas a nivel de suelo. Cada una de las plantas cosechadas fue separada en tallo principal, ramificaciones, semillas y carpelos. Una sub-muestra compuesta por la mitad de las plantas cosechadas de cada muestra fue utilizada para determinar el número de ramificaciones, el número de nudos y nudos reproductivos del tallo principal y de las ramificaciones, y el número de vainas en el tallo principal y en las ramificaciones. El peso unitario de las semillas (PUS, mg) fue determinado como el peso seco promedio de 480 semillas elegidas al azar. El número de semillas desarrolladas fue determinado como el cociente entre el rendimiento en semilla y el peso unitario de las semillas. El número de vainas (NVS) se obtuvo contando el total de vainas de cada muestra cosechada. El porcentaje de abscisión de vainas se calculó como el

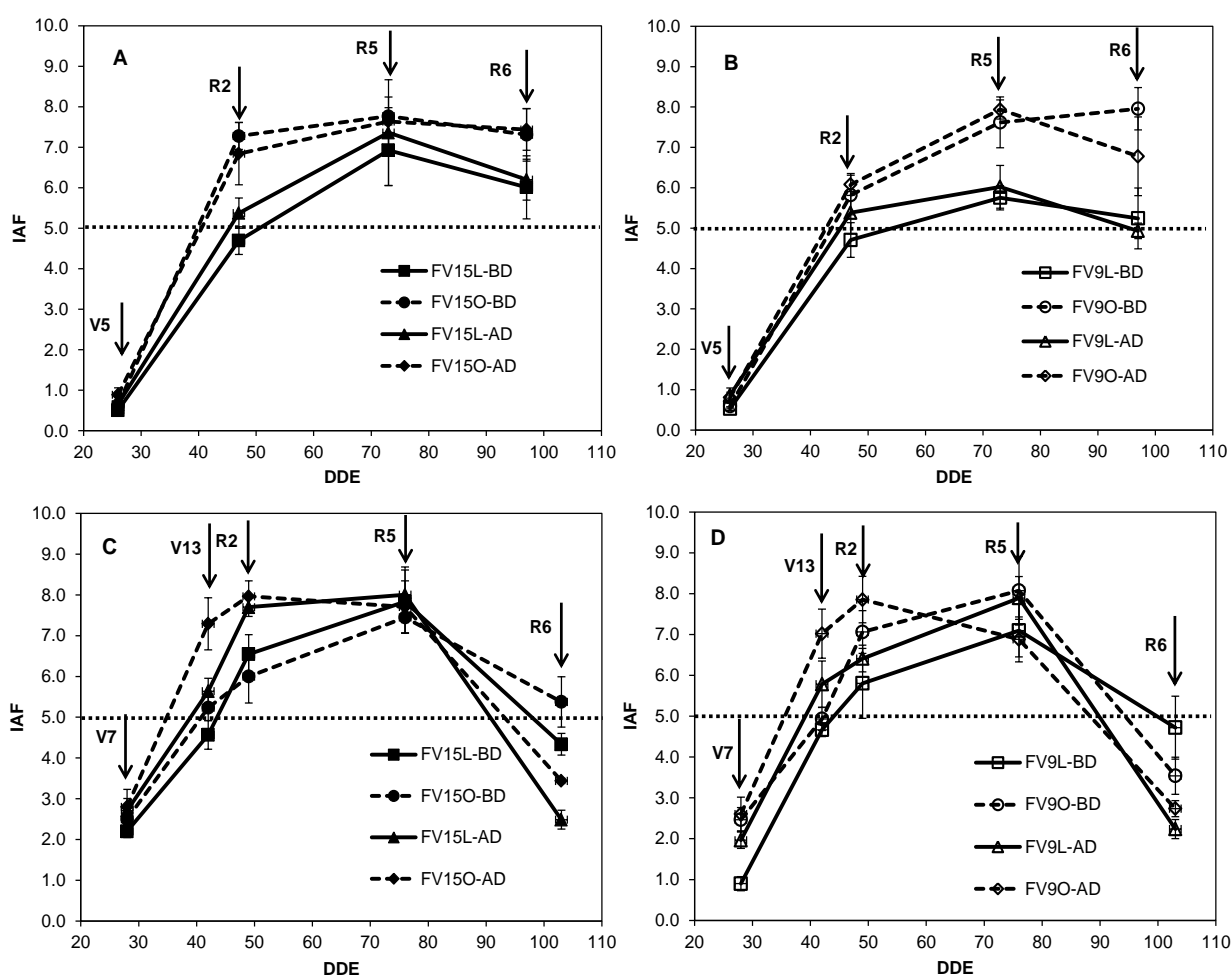
cociente entre el número de vainas a cosecha y el número de vainas en R5. El NPSV fue determinado contando el número de vainas con 1(loc1), 2 (loc2), 3 (loc3), 4 (loc4) y 5(loc5) lóculos y obteniendo el resultado de la siguiente ecuación: $[(loc1 \times 1) + (loc2 \times 2) + (loc3 \times 3) + (loc4 \times 4) + (loc5 \times 5) / \text{número de vainas}]$. Se consideraron todos los lóculos, independientemente del estado de desarrollo de las semillas (*i.e.* lóculos con semillas completamente desarrolladas y lóculos con semillas incompletamente desarrolladas y abortadas). El número potencial de semillas fue determinado como el producto entre el NPSV y el número de NVS. El número promedio de semillas desarrolladas por vaina ($NPSV_D$) se calculó como el cociente entre NSS y NVS. El aborto de semillas se calculó como: $1 - (NPSV_D/NPSV)$. En R8 se calculó la partición de materia seca a estructuras reproductivas (vainas) como el cociente entre el peso seco total de las vainas y el peso seco de la biomasa aérea total. La partición de materia seca a grano (índice de cosecha, IC) se calculó como el cociente entre el peso seco total de las semillas y el peso seco de la biomasa aérea total. Para ambos cálculos de partición, el peso seco de las hojas caídas no fue incluido.

Los datos fueron sometidos a análisis de la variancia (ANVA) y las medias de los tratamientos fueron comparadas a través del análisis de mínimas diferencias significativas (LSD). Los efectos de bloque, densidad, forma de hoja y las líneas (anidadas en forma de hoja) y sus interacciones para cada estación de crecimiento fueron analizados para evaluar su significancia. Para aquellas variables cuya distribución no se ajustó a una normal, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952). La relación entre las variables se analizó mediante análisis de regresión. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS University Edition (2017).

I.4. RESULTADOS

Morfología foliar: su relación con parámetros de crecimiento

En promedio las líneas con folíolos oblongos (líneas O: FV-15O y FV-9O) desarrollaron mayores IAF comparadas con las líneas con folíolos lanceolados (líneas L: FV-15L y FV-9L), medido como el área bajo la curva para ambas densidades y experimentos. Las diferencias fueron mayores en el Exp. 13/14, superando las líneas O en un 25 % a las líneas L, mientras que en el Exp. 14/15 las diferencias entre O y L fueron del 6 %.



Continuación Figura 4.

Figura 4. Evolución del índice de área foliar (IAF) en función de los días desde emergencia (DDE) para los pares de líneas FV-15L/FV-15O (símbolos llenos) y FV-9L/FV-9O (símbolos vacíos) en los Exp. 13/14 (Fig. 4 A y B) y Exp. 14/15 (Fig. 4 C y D). Cuadrados y triángulos corresponden a los genotipos lanceolados sembrados en baja y alta densidad (BD y AD, respectivamente). Círculos y rombos corresponden a los genotipos oblongos sembrados en BD y AD, respectivamente. Cada uno de los puntos representa las medias \pm error estándar de tres repeticiones. Las flechas indican los estadios vegetativos (V5, V7 y V13), plena floración (R2), inicio de crecimiento de las semillas (R5) y semilla completamente desarrollada (R6). La línea de puntos en cada una de las figuras indica el índice de área foliar crítico.

En relación con la evolución del IAF, las líneas mostraron diferencias en las dos campañas analizadas (Figura 4). En el Exp. 13/14, las líneas L mostraron menor IAF que las O a lo largo de todo el ciclo del cultivo, independientemente de la densidad de siembra. Para el par FV-15, las mayores diferencias se observaron en el estadio R2. En ese estadio, el IAF promedio de ambas densidades fue 5,0 y 7,1 para FV-15L y FV-15O, respectivamente ($P < 0,01$). En cambio, para el par FV-9, las mayores diferencias se detectaron en el estadio R5, donde el IAF promedio de ambas densidades fue 5,9 y 7,8 para FV-9L y FV-9O, respectivamente ($P < 0,01$) (Figura 4 A y B).

En el Exp. 14/15 el par FV-9 mostró el mismo patrón de evolución del IAF que en el experimento anterior, aunque las mayores diferencias se observaron en R2 (6,1 y 7,5 en las líneas L y O respectivamente, $P < 0,01$, promedio de ambas densidades). Para el par de líneas FV-15, si bien se mantuvo la misma tendencia, donde los genotipos lanceolados presentaron menor IAF que los oblongos, no se detectaron diferencias significativas para ningún estadio analizado excepto para R6, donde la línea FV-15L presentó un IAF de 3,4 y su contraparte oblonga de 4,4 ($P < 0,01$), promedio de ambas densidades (Figura 4 C y D).

Las diferencias en IAF entre densidades de siembra solo fueron evidentes para los primeros estadios en ambas campañas. Para el Exp. 13/14 los valores de IAF alcanzados en el estadio V5 fueron de 0,6 en BD y de 0,8 en AD ($P < 0,05$). En cambio, en el Exp. 14/15 los valores de IAF en el estadio V7 fueron de 2,0 y 2,5 para BD y AD, respectivamente, $P < 0,05$). En este experimento también se observaron diferencias en el IAF en el estadio R2 (6,4 y 7,5 para BD y AD, respectivamente, $P < 0,001$).

En ambos experimentos el IAF disminuyó a partir de R5. Las mayores pérdidas de área foliar entre R5 y R6 se registraron en AD. En el Exp. 13/14 el IAF disminuyó un 12 y 8 % en AD y BD, respectivamente; mientras que en el Exp. 14/15 el IAF cayó un 64 y 41 % en AD y BD, respectivamente.

El IAF crítico (IAFc) calculado utilizando los datos de todas las líneas, en ambas densidades y experimentos, fue igual a 5,0. En el Exp. 13/14 todas las líneas alcanzaron el

IAFc antes de R2 (47 DDE), excepto para las líneas lanceoladas en BD que lo hicieron poco después (Figura 4 A y B). En el Exp. 14/15 todas las líneas alcanzaron el IAFc alrededor de V13 (42 DDE) excepto para las líneas lanceoladas en BD que lo hicieron poco después. En el Exp. 14/15 todas las líneas superaron el IAFc antes de R2 (49 DDE) (Figura 4 C y D).

Durante la etapa vegetativa (período comprendido desde V5 y V7 para el Exp. 13/14 y el Exp. 14/15, respectivamente, hasta R2) las líneas L mostraron consistentemente menor IAF que las líneas O en ambos experimentos (2,8 y 3,6 promedio de ambas densidades para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,01$, en el Exp 13/14 y 4,3 y 4,9 promedio de ambas densidades para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,001$, en el Exp 14/15). A su vez, para esa misma etapa no se detectaron diferencias significativas en RI, entre las líneas L y O (excepto para el par FV-9 en BD en el Exp. 14/15) (Tabla 3). Cuando se calculó la RI en función del IAF (ERI) para el mismo período, la ERI fue siempre mayor en las líneas L que en las O. En el Exp. 13/14 la ERI fue de 25,1 y 20,2 % para las líneas L y O, respectivamente ($P < 0,01$); mientras que para el Exp. 14/15 la ERI fue de 20,6 y 18,8 % para las líneas L y O, respectivamente ($P < 0,05$). Además, la TAN del período fue mayor en las líneas L respecto de las O, siendo significativas las diferencias solo en el Exp. 13/14 (7,0 y 6,0 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}_{\text{hoja}}\cdot\text{d}^{-1}$ para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,05$), mientras que en el Exp. 14/15 la TAN fue 3,5 y 3,3 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}_{\text{hoja}}\cdot\text{d}^{-1}$ para las líneas L y O, respectivamente, $P = 0,50$. Durante dicho período no se detectaron diferencias entre las líneas L y O para la variable TCC (Tabla 3).

En R2 todos los genotipos habían alcanzado o superado el 95% de la RI en ambas densidades.

Tabla 3. Índice de área foliar (IAF), radiación fotosintética interceptada (RI), eficiencia de intercepción de la radiación (ERI), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de crecimiento del cultivo (TCC), durante el período V5-R2 (Exp. 13/14) y V7-R2 (Exp. 14/15) para las líneas FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O, en baja (BD) y alta (AD).

Líneas	Exp. 13/14										Exp. 14/15											
	IAF		RI		ERI		TAN		TCC		IAF		RI		ERI		TAN		TCC			
	(m ² _H .m ⁻² _S)	(%)	(%)	(%)	(g.m ⁻² _H .d ⁻¹)	(g.m ⁻² _S .d ⁻¹)	(m ² _H .m ⁻² _S)	(%)	(%)	(%)	(g.m ⁻² _H .d ⁻¹)	(g.m ⁻² _S .d ⁻¹)	(m ² _H .m ⁻² _S)	(%)	(%)	(%)	(g.m ⁻² _H .d ⁻¹)	(g.m ⁻² _S .d ⁻¹)	(g.m ⁻² _S .d ⁻¹)	(g.m ⁻² _S .d ⁻¹)		
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD		
FV-9L	2,6	3,1	68,4	69,8	26,6	22,7	7,2	6,0	13,2	13,7	3,4	4,2	74,3	90,9	22,8	21,9	2,8	4,2	16,1	17,3		
FV-9O	3,2	3,4	70,4	72,1	22,4	21,2	6,5	6,2	14,4	15,3	4,8	5,3	87,9	94,8	18,6	18,3	2,6	3,7	18,4	17,7		
FV-15L	2,6	3,0	67,1	75,1	26,0	25,1	7,6	7,3	14,4	16,4	4,4	5,2	86,3	93,3	19,8	18,0	2,8	4,1	18,5	19,0		
FV-15O	4,0	3,9	69,2	74,2	17,4	19,8	6,8	4,8	17,6	12,6	4,3	5,4	88,1	93,5	20,9	17,4	3,4	3,6	20,0	18,6		
Media para forma de hoja (FH)																						
L⁽¹⁾	2,8 b ⁽⁴⁾		70,1		25,1 a		7,0 a		14,4		4,3 b		80,3 b		92,1		20,6 a		3,5		17,7	
O	3,6 a		71,5		20,2 b		6,0 b		15,0		4,9 a		88,0 a		94,1		18,8 b		3,3		18,6	
Media para densidad (D)																						
BD⁽²⁾	3,1		68,8 b		23,1		7,0 a		14,9		4,2 b		84,2 b		20,5 a		2,9 b		18,2			
AD	3,4		72,8 a		22,2		6,0 b		14,5		5,0 a		93,1 a		18,9 b		3,9 a		18,1			
ANVA⁽³⁾																						
L vs. O	*** ⁽⁵⁾		ns		***						****		****		**							
BD vs. AD	ns		*		ns						****		****		*							
FH x D	ns		ns		ns						ns		**		ns							

(1) L y O, indican lanceolada y oblonga, respectivamente.

(2) BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

(3) ANVA: análisis de la variancia.

(4) Letras diferentes indican diferencias significativas según test-t ($P < 0,05$) para TCC y TAN y según test de LSD ($P < 0,05$) para IAF, RI y ERI.

(5) *, **, *** y **** indican diferencias significativas con un nivel de probabilidad de 0,10, 0,05, 0,01 y 0,001, respectivamente, y ns indica diferencias no significativas.

A su vez, para el período R2-R5 en la Tabla 4 se muestran los valores promedio de IAF, RI y TCC. No obstante que el IAF y la RI superaron sus respectivos umbrales críticos (i.e. 5 para IAF y 95% para RI) en los dos pares de líneas, para las dos densidades y campañas evaluadas, en el Exp. 13/14 el IAF y la RI fueron mayores para las líneas O que para las L, mientras que en el Exp 14/15 estas diferencias solo se mantuvieron para la RI (Tabla 4). En el Exp.13/14 las líneas L presentaron menor TCC que las O ($P < 0,05$), mientras que en el Exp 14/15 las TCC fueron similares en ambas morfologías foliares. Por otro lado, para el mismo período no se registraron diferencias en la TAN de las líneas L respecto de las O, en ninguno de los dos experimentos (datos no presentados).

Tabla 4. Índice de área foliar (IAF), radiación fotosintética interceptada (RI) y tasa de crecimiento del cultivo (TCC), durante el período R2-R5, para las líneas FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O, en baja (BD) y alta (AD) densidad en los Exp. 13/14 y Exp. 14/15.

LÍNEAS	Exp. 13/14						Exp. 14/15					
	IAF		RI (%)		TCC ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}\cdot\text{d}^{-1}$)		IAF		RI (%)		TCC ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}\cdot\text{d}^{-1}$)	
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
FV9-L	5,2	5,7	97,1	97,2	19,5	16,7	6,5	7,1	97,2	99,0	17,6	26,3
FV9-O	6,7	7,0	98,3	98,6	23,5	22,8	7,6	7,4	99,3	99,5	18,6	25,8
FV15-L	5,8	6,4	97,4	97,5	22,2	23,4	7,2	7,9	98,7	99,2	19,8	28,4
FV15-O	7,5	7,2	98,2	98,8	25,7	27,4	6,7	7,9	99,3	99,3	21,0	28,3
Media para forma de hoja (FH)												
L ⁽¹⁾	5,8 a ⁽⁴⁾		97,3 a		20,5 a		7,2		98,5 a		23,1	
O	7,1 b		98,5 b		24,8 b		7,4		99,3 b		23,4	
Media para densidad (D)												
BD ⁽²⁾	6,3		97,7		22,6		7,0 b		98,6 a		19,3 a	
AD	6,6		98,0		22,7		7,6 a		99,2 b		27,2 b	
Anva⁽³⁾												
L vs. O	*** ⁽⁵⁾		***		-		ns		***		-	
BD vs. AD	ns		ns		-		**		**		-	
FH x D	ns		ns		-		ns		ns		-	

⁽¹⁾ L y O, indican lanceolada y oblonga, respectivamente.

⁽²⁾ BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

⁽³⁾ ANVA: análisis de la variancia.

⁽⁴⁾ Letras diferentes indican diferencias significativas según test-t ($P < 0,05$) para TCC y según test de LSD ($P < 0,05$) para IAF y RI.

⁽⁵⁾ ** y *** indican diferencias significativas con un nivel de probabilidad de 0,05 y 0,01, respectivamente, y ns indica diferencias no significativas.

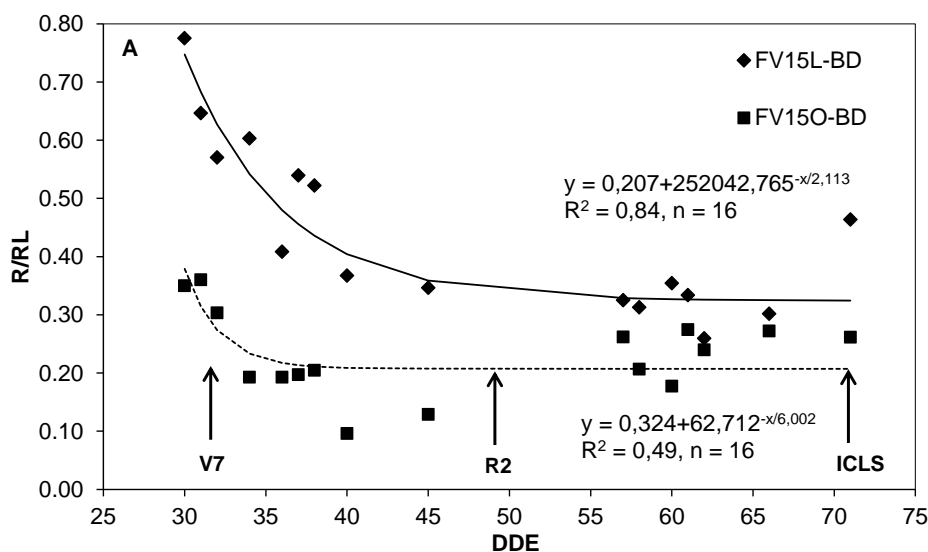
Durante el período R5-R6 todas las líneas mantuvieron valores de IAF por encima del IAFc en el Exp. 13/14 (Figura 4 A y B). No obstante en este experimento las líneas L mostraron menor IAF respecto de las O en ambas densidades (en promedio 6,1 y 7,6 para L y O, respectivamente, $P < 0,0001$). Sin embargo en el Exp. 14/15 el IAF fue similar para los

dos pares de líneas en las dos densidades (en promedio 5,6 y 5,7 para las líneas L y O, respectivamente, $P = 0,75$). A pesar de ello, se observó que después de los 90 DDE (alrededor de la mitad del período de llenado) el IAF cayó por debajo del IAFc en todas las líneas, excepto para FV-15O en BD (Figura 4 C).

Morfología foliar: su efecto sobre la evolución de la relación R/RL y la RFA en los estratos medios del canopy

Durante el Exp. 14/15, se midió la evolución de la relación R/RL y la RFA en los estratos medios del canopy (RFA_M) del par de líneas FV-15L y FV-15O, a partir de los 30 DDE hasta el inicio del crecimiento lineal de las semillas (ICLS).

La relación R/RL disminuyó exponencialmente en función de los DDE, con diferencias asociadas a la morfología foliar y la densidad de siembra (Figura 5). La relación R/RL fue siempre mayor en la línea L respecto de la O, y en BD respecto de AD. En consecuencia, las mayores diferencias entre L y O se observaron en BD (cf. Figura 5 A y B).



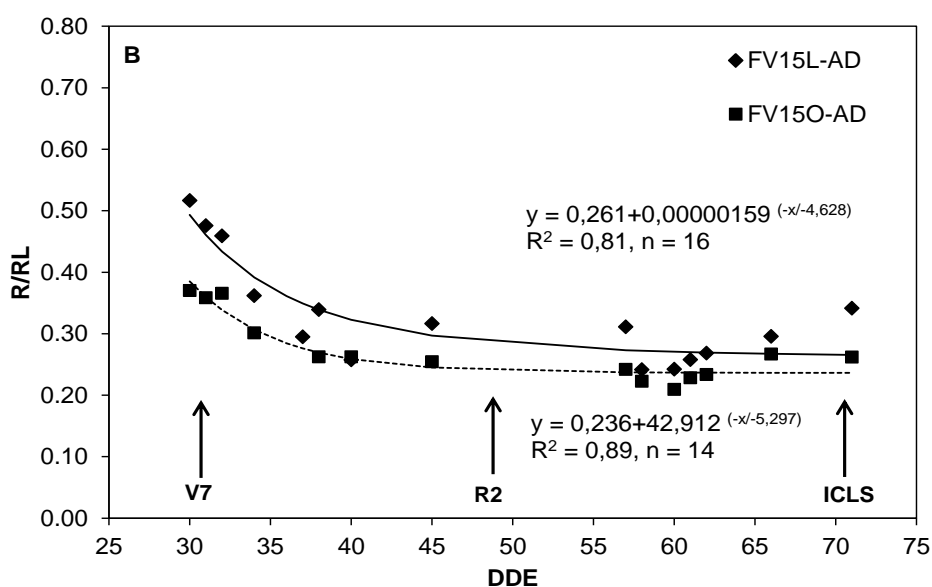


Figura 5. Evolución de la relación rojo/rojo lejano (R/RL) a partir de los 30 días desde la emergencia (DDE) hasta el inicio del crecimiento lineal de las semillas (ICLS), para el par de isolíneas FV15-L y FV15-O, en baja densidad (BD, Fig. 5 A) y en alta densidad (AD, Fig. 5 B), en el Exp. 14/15. Las flechas indican los estadios vegetativo (V7), plena floración (R2) e ICLS. Las líneas sólidas y punteadas indican las funciones ajustadas para FV15-L y FV15-O, respectivamente. Los valores de R/RL corresponden a los promedios de las mediciones realizadas entre plantas y entresurcos, obtenidas cada 30 minutos desde las 10 hasta las 17 horas, con sensores localizados a la mitad de la altura del canopeo (ver Materiales y Métodos por detalles).

En BD (Figura 5 A), los valores ajustados de R/RL para L y O fueron: 0,74 y 0,38 ($P < 0,05$) a los 30 DDE (V7 + 2d); 0,37 y 0,21 ($P < 0,01$) a los 49 DDE (R2) y 0,33 y 0,21 ($P < 0,05$) a los 72 DDE (ICLS), respectivamente.

En AD (Figura 5 B), los valores de R/RL para las líneas L y O fueron, 0,49 y 0,39 ($P < 0,10$) a los 30 DDE (V7 + 2 d); 0,32 y 0,25 ($P < 0,10$) a los 49 DDE (R2) y 0,27 y 0,24 ($P = 0,30$) a los 72 DDE (ICLS), respectivamente.

En el mismo experimento (Exp.14/15), durante el mismo período (30 DDE-ICLS) y para el mismo par de líneas (FV-15L y FV-15O) se midió la evolución de la RFA a nivel del estrato medio del canopeo (RFA_M). La RFA_M disminuyó exponencialmente en función de los DDE, con diferencias asociadas a la morfología foliar y la densidad de siembra (Figura 6). La RFA_M fue mayor en la línea L respecto de la O, y en BD respecto de AD (Figura 6). En consecuencia, las mayores diferencias entre L y O se observaron en BD (cf. Figura 6 A y 6 B).

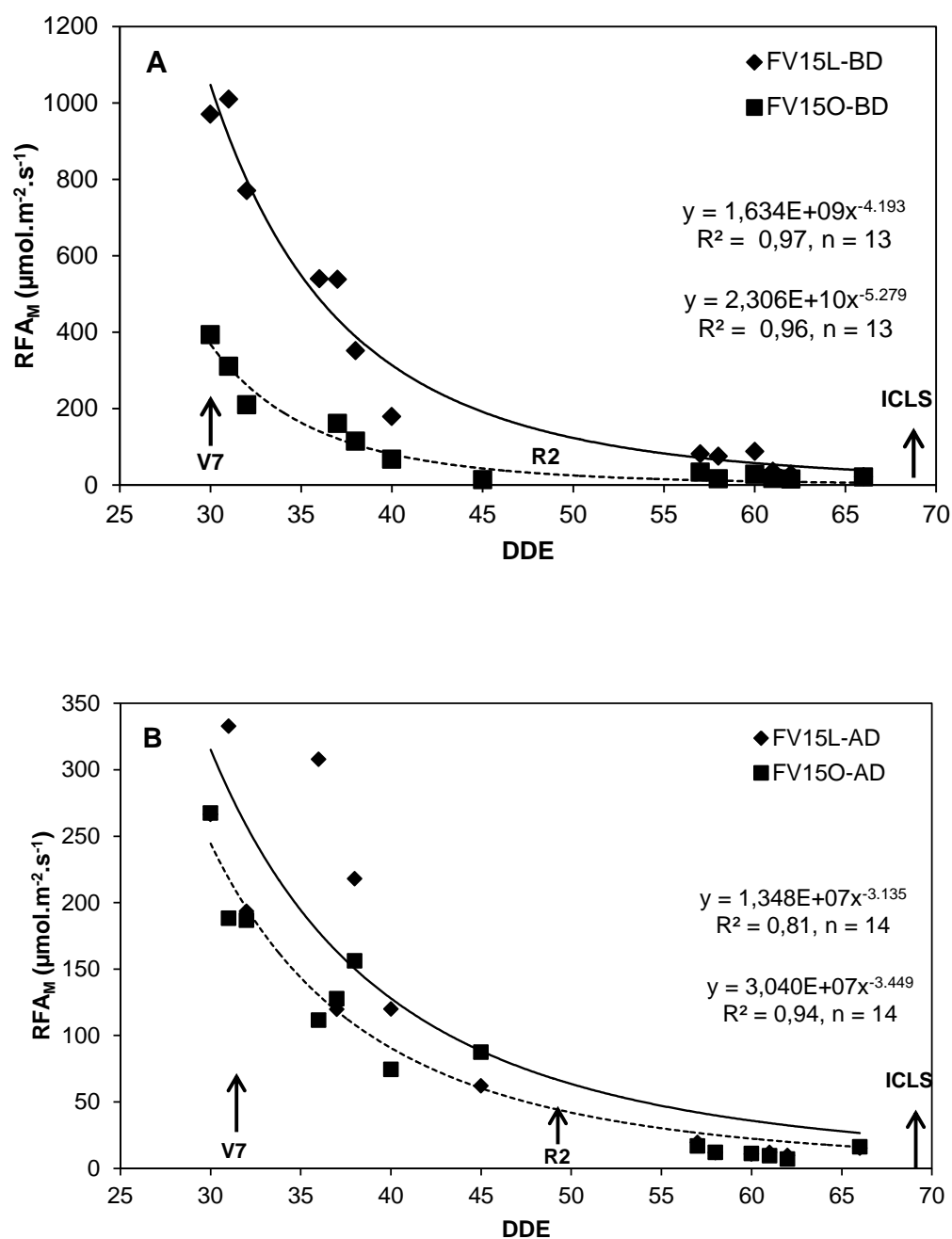


Figura 6. Evolución de la radiación fotosintéticamente activa medida a nivel de los estratos medios del canopeo (RFA_M) a partir de los 30 días desde la emergencia (DDE) hasta el inicio del crecimiento lineal de las semillas (ICLS), para el par de líneas FV15-L y FV15-O, en baja densidad (BD, Figura 6 A) y en alta densidad (AD, Figura 6 B) para el Exp. 14/15. Las flechas indican los estadios vegetativo (V7), plena floración (R2) e ICLS. Las líneas sólida y punteada indican las funciones ajustadas para FV15-L y FV15-O, respectivamente. Los valores de RFA_M corresponden a los promedios de las mediciones realizadas entre plantas y entresurcos, obtenidas cada 30 minutos desde las 10 hasta las 17 horas, con sensores localizados a la mitad de la altura del canopeo (ver Materiales y Métodos por detalles).

En BD, los valores de ajustados de RFA_M para L y O fueron: 1047 y 368 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P < 0,001$) a los 30 DDE (V7+2 d), 192 y 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P < 0,01$) en R2 y 38 y 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P < 0,10$) al ICLS, respectivamente.

En AD, los valores de ajustados de RFA_M para L y O fueron: 315 y 244 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P = 0,23$) a los 30 DDE (V7+2 d), 65 y 43 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P = 0,43$) en R2, y 27 y 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($P = 0,53$) al ICLS, respectivamente. Aunque la línea FV-15L tuvo mayores valores de RFA_M que la línea FV-15O durante el período medido, las diferencias no fueron significativas en ningún caso.

Morfología foliar: su relación con el número de vainas iniciadas

Los Exps. 13/14 y 14/15 se presentan por separado debido a que para vainas iniciadas y vainas por nudo reproductivo hubo interacción significativa FH x Exp. ($P < 0,10$).

En la Tabla 5 A (Exp. 13/14) y en la Tabla 5 B (Exp. 14/15) se muestran los valores de vainas iniciadas (VI), nudos totales (NT), nudos reproductivos (NR) y VI/NR, medidos en el estadio R5. Para las variables analizadas se observó un efecto significativo de la forma de hoja (FH, $P < 0,05$) y de la densidad (D, $P < 0,10$), a excepción de las VI/NR en las que se detectaron interacción significativa FH x D en ambos experimentos ($P < 0,10$).

Las líneas L presentaron mayor número de VI que las líneas O. Las diferencias entre L y O fueron menores en el Exp. 13/14 (10 %; $P < 0,05$, Tabla 5 A) que en el Exp. 14/15 (27 %; $P < 0,001$, Tabla 5 B).

Las variaciones en las VI son consecuencia de variaciones en los NT, NR y VI/NR. Para ambos experimentos, la diferencia entre L y O en las VI estuvo asociado a diferentes componentes dependiendo de la densidad. En BD el mayor número VI en las líneas L se debió fundamentalmente a un incremento en la cantidad de VI/NR ($P < 0,05$, para el Exp. 13/14 y $P < 0,01$ para el Exp. 14/15, Tabla 5 A y Tabla 5 B, respectivamente). En cambio, en AD, el mayor número de VI en las líneas L se debió principalmente a un aumento en la cantidad de NT ($P < 0,05$, para ambos experimentos) y de NR ($P < 0,05$, para ambos experimentos), sin diferencias en las VI/NR (Tablas 5 A y 5 B).

Cuando se compararon ambas densidades las VI fueron mayores en BD respecto de AD, aunque las diferencias solo fueron significativas en el Exp. 13/14 ($P < 0,10$). Este aumento en el número de VI en BD estuvo relacionado con un incremento en el número de VI/NR (Tablas 5 A y 5 B).

Tabla 5A. Vainas iniciadas (VI), nudos totales (NT), nudos reproductivos (NR) vainas iniciadas/nudo reproductivo (VI/NR), para las líneas FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O en baja (BD) y alta (AD) densidad en el Exp. 13/14.

Líneas	Vainas Iniciadas (VI)		Nudos Totales (NT)		Nudos Reproduc. (NR)		VI/NR	
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
	----- (n ^o .m ⁻²) -----							
FV-9L	1970	1782	1037	1285	773	950	2,7	1,9
FV-9O	1843	1735	1011	1119	757	808	2,4	2,2
FV-15L	1958	1868	1015	1193	765	892	2,5	2,1
FV-15O	1703	1586	1023	1079	769	810	2,2	2,0
Media para forma de hoja (FH)								
L ⁽¹⁾	1894 a ⁽⁴⁾		1026	1239 a	770	921 a	2,6 a	2,0
O	1717 b		1017	1099 b	763	809 b	2,3 b	2,1
Media para densidad (D)								
BD ⁽²⁾	1833 a		1000 b		749 b		2,5 a	
AD	1743 b		1169 a		865 a		2,0 b	
ANVA ⁽³⁾								
L vs. O	** ⁽⁵⁾		*		*		ns	
BD vs. AD	*		***		***		****	
FH x D	ns		ns		ns		*	

(1) L y O, indican lanceolada y oblonga, respectivamente.

(2) BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

(3) ANVA: análisis de la variancia.

(4) Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos según test de LSD ($P < 0,05$).

(5) *, **, ***, **** indican diferencias significativas al 0,10, 0,05, 0,01 y 0,001 nivel de probabilidad, respectivamente, y ns, diferencias no significativas, para el ANVA.

Tabla 5B. Vainas iniciadas (VI), nudos totales (NT), nudos reproductivos (NR), vainas iniciadas/nudo reproductivo (VI/NR), para las líneas FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O en baja (BD) y alta (AD) densidad en el Exp. 14/15.

Líneas	Vainas Iniciadas (VI)		Nudos Totales (NT)		Nudos Reproduc. (NR)		VI/NR	
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
----- (nº.m ⁻²) -----								
FV-9L	2919	2705	1205	1481	962	1132	3,1	2,4
FV-9O	2279	1961	1105	1203	859	887	2,7	2,2
FV-15L	2451	2347	1081	1318	837	1024	2,9	2,3
FV-15O	1896	2075	1053	1200	805	949	2,4	2,2
Media para forma de hoja (FH)								
L⁽¹⁾	2605 a ⁽⁴⁾		1143	1400 a	900	1078 a	3,0 a	2,3
O	2052 b		1079	1201 b	832	918 b	2,5 b	2,2
Media para densidad (D)								
BD⁽²⁾	2387		1111 b		866 b		2,8 a	
AD	2272		1301 a		998 a		2,3 b	
ANVA⁽³⁾								
L vs. O	**** ⁽⁵⁾		**		**		ns	
BD vs. AD	ns		***		**		****	
FH x D	ns		ns		ns		*	

(1) L y O, indican lanceolada y oblonga, respectivamente.

(2) BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

(3) ANVA: análisis de la variancia.

(4) Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos según test de LSD ($P < 0,05$).

(5) *, **, ***, **** indican diferencias significativas al 0,1; 0,05; 0,01 y 0,001 nivel de probabilidad, respectivamente, y ns, diferencias no significativa, para el ANVA.

Las variaciones observadas en las VI estuvieron altamente asociadas a variaciones en el número de vainas de las ramificaciones (Figura 7). A su vez, dado que el número de ramificaciones por unidad de superficie fue similar para los dos tipos de morfología foliar y para ambas densidades, las variaciones observadas en el número de vainas de las ramificaciones se debieron principalmente a cambios en los NR ($R^2 = 0,77$; $P < 0,0001$) y en las VI/NR de las ramificaciones ($R^2 = 0,73$; $P < 0,0001$).

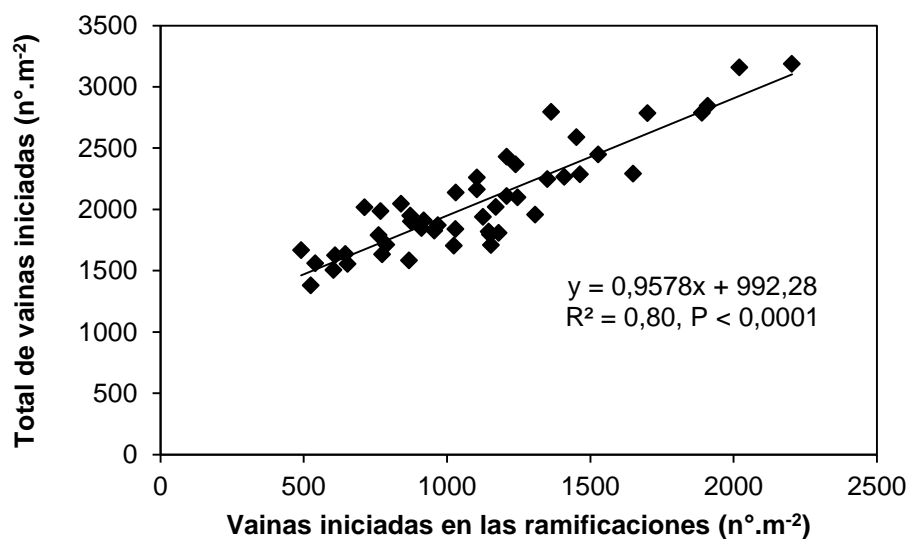


Figura 7. Total de vainas iniciadas en función de las vainas iniciadas en las ramificaciones en R5, para los dos pares de líneas, en ambas densidades y en ambos experimentos.

Las VI en R5 estuvieron inversamente asociadas con el IAF promedio del período V5-R5 (Exp. 13/14) y V7-R5 (Exp.14/15) (Figura 8).

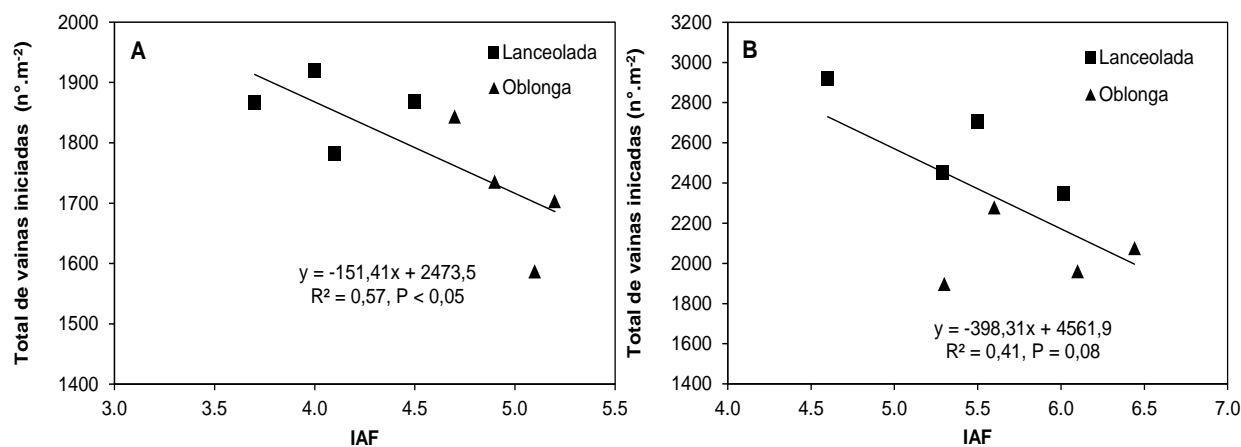


Figura 8. Número de vainas iniciadas en R5 en función del índice de área foliar (IAF) promedio del período V5-R5 (Exp. 13/14, Fig. 8A) y V7-R5 (Exp.14/15, Fig. 8B), para las líneas lanceoladas (cuadrados) y oblongas (triángulos).

De manera similar a lo ocurrido con el IAF, la asociación entre VI y RI promedio del período V5-R5 (Exp. 13/14) y V7-R5 (Exp. 14/15) también fue negativa ($R^2 = 0,44$; $P = 0,08$ y $R^2 = 0,47$; $P = 0,06$, para los Exp. 13/14 y 14/15, respectivamente). Por otra parte, no se detectó asociación entre las VI y la TCC_{R2-R5} ($R^2 = 0,29$; $P = 0,17$ y $R^2 = 0,10$; $P = 0,45$, para los Exp. 13/14 y 14/15, respectivamente).

Sin embargo, cuando se relacionaron las VI con la relación R/RL, se encontró que las VI estuvieron directa y positivamente asociadas con la relación R/RL en el interior del canopeo ($R^2 = 0,82$, $P < 0,001$) (Figura 9).

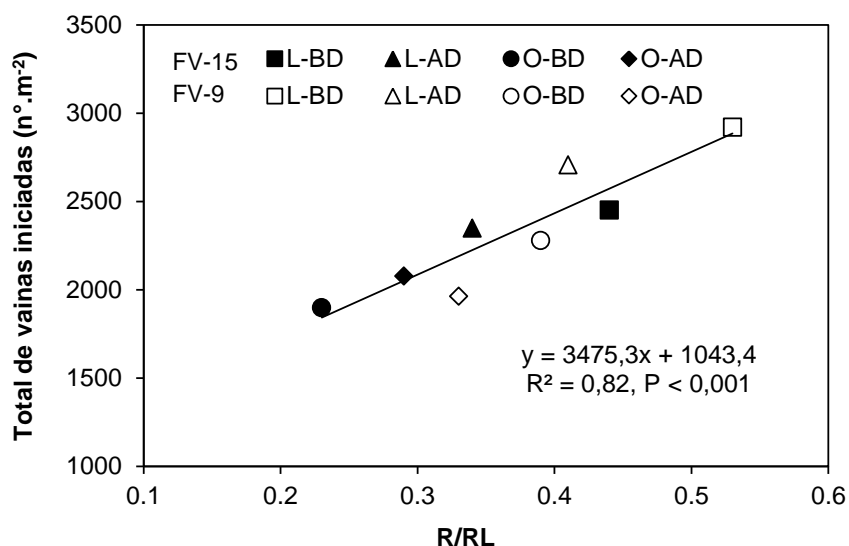


Figura 9. Total de vainas iniciadas en R5 en función de la relación Rojo/Rojo Lejano (R/RL) promedio calculada para el período comprendido entre los 30 días desde la emergencia y R5, para las líneas FV-15 (símbolos cerrados) y FV-9 (símbolos abiertos) en el Exp. 14/15. Los cuadrados y triángulos corresponden a las líneas lanceoladas en baja y alta densidad (L-BD y L-AD, respectivamente). Los círculos y rombos indican las líneas oblongas en baja y alta densidad (O-BD y O-AD, respectivamente).

Morfología foliar: Relación destino-fuente y partición de materia seca en R5

La relación destino-fuente para el período de formación de las vainas se calculó a través del cociente entre el número de vainas iniciadas en R5 y el IAF promedio para el período R2-R5 (Tabla 6). La relación destino-fuente fue mayor en las líneas L que en las O ($P < 0,01$) y en BD que en AD ($P < 0,05$), en los dos experimentos evaluados (Tabla 6).

Tabla 6. Relación destino-fuente medida como el cociente entre el número de vainas iniciadas en R5 y el índice de área foliar promedio para el período R2-R5, en Exp.13/14 y Exp. 14/15.

LÍNEAS	Exp. 13/14		Exp. 14/15	
	BD	AD	BD	AD
	----- (n°.m ⁻²) -----			
FV-9L	382	316	452	378
FV-9O	275	248	300	266
FV-15L	339	297	342	297
FV-15O	228	221	282	264
Media para forma de hoja (FH)				
L⁽¹⁾	334 a ⁽⁴⁾		367 a	
O	243 b		278 b	
Media para densidad (D)				
BD⁽²⁾	306 a		344 a	
AD	271 b		301 b	
ANVA⁽³⁾				
L vs. O	**** ⁽⁵⁾		***	
BD vs. AD	**		***	
FH x D	ns		ns	

(1) L y O, indican hoja con folíolos lanceolados y oblongos, respectivamente.

(2) BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

(3) ANVA: análisis de la variancia.

(4) Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos según test de LSD ($P < 0,05$).

(5) *, **, ***, **** indican diferencias significativas al 0,1, 0,05, 0,01 y 0,001 nivel de probabilidad, respectivamente, y ns, diferencias no significativa, para el ANVA.

Respecto de la partición de materia seca, en el Exp. 13/14, las líneas L presentaron mayor partición a vainas que las líneas O: 0,19 y 0,16 para L y O, respectivamente en BD ($P < 0,001$) y 0,20 y 0,17 para L y O, respectivamente en AD ($P < 0,01$). En el Exp. 14/15, las líneas L presentaron mayor partición a vainas en relación a las líneas O solo en BD, 0,32 y 0,29, para L y O, respectivamente (aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas). En cambio, en AD para las dos morfologías foliares, se observaron valores de partición similares (0,35).

En ambos experimentos, hubo más partición de materia seca a las ramificaciones en BD que en AD (0,13 y 0,04, para BD y AD, respectivamente, en el Exp. 13/14; y 0,19 y 0,08, para BD y AD, respectivamente, en el Exp. 14/15, $P < 0,0001$). Por el contrario, la partición a los tallos principales fue mayor en AD que en BD (0,35 y 0,24, para AD y BD,

respectivamente, en el Exp. 13/14; y 0,32 y 0,21, para AD y BD, respectivamente, en el Exp. 14/15, $P < 0,0001$).

Rendimiento: componentes y su relación con la morfología foliar

Para las variables analizadas a cosecha no se encontró interacción entre experimentos y las demás fuentes de variación (densidad, forma de hoja y genotipo; $P > 0,10$). Es por ello que los resultados a cosecha de los Exp. 13/14 y Exp. 14/15 se presentan en forma conjunta.

Las variaciones observadas en rendimiento estuvieron asociadas con variaciones en el NSS ($R^2 = 0,77$; $P < 0,0001$). Por otro lado, no hubo asociación entre el rendimiento y el PUS ($R^2 = 0,0005$; $P = 0,88$).

Cuando se analizó el efecto de la forma de hoja sobre el rendimiento se observó que las líneas L presentaron mayores rendimientos que las O en BD, mientras que en AD no se detectó diferencias entre L y O (Tabla 7).

En BD, el incremento de rendimiento de las líneas L respecto de las O fue del 28 % ($P < 0,05$) y estuvo asociado con aumentos en el NSS en las líneas L respecto de O (40%, $P < 0,05$). A su vez, este mayor NSS de las líneas L respecto de las O se debió al incremento en el NVS (18 %, $P < 0,05$) y al incremento en el NPSV_D (17 %, $P < 0,05$) (Tabla 7). Este incremento de rendimiento ocurrió a pesar de que el PUS de las líneas L fue un 8 % menor que el de las O ($P < 0,05$) (Tabla 7).

En AD, no hubo diferencias significativas en el rendimiento entre ambas morfologías foliares, no obstante las líneas L presentaron mayor NSS que las O (10%, $P < 0,05$) (Tabla 7). Este incremento se debió exclusivamente al mayor NPSV_D en L respecto de O (17 %, $P < 0,05$), ya que no hubo cambios en el NVS entre las líneas L y O (Tabla 7). En este caso el aumento en el NPSV_D fue neutralizado por el menor PUS de las líneas L respecto de las O (8 %, $P < 0,05$) (Tabla 7).

El NVS es el resultado de la diferencia entre el número de vainas iniciadas y abscionadas. Las líneas L presentaron mayor NVS que las O solo en BD ($P < 0,05$; Tabla 7). A su vez, los porcentajes de abscisión no mostraron diferencias entre las líneas L y O en BD, mientras que la abscisión fue mayor en las líneas L respecto de las O en AD ($P < 0,05$; Tabla 7).

El NPSV y NPSV_D fue un 24 y 17 % mayor en las líneas L que en las O, mientras que el aborto de semillas fue un 5 % mayor en las líneas L que en las O ($P < 0,05$; Tabla 7). En ninguna de las variables mencionadas se encontró interacción FH x D (Tabla 7).

En relación al PUS, no hubo interacción entre FH y densidad. Las líneas O tuvieron siempre mayor PUS que las L (164 y 151 mg para O y L, respectivamente, Tabla 7). No obstante, este mayor PUS de las líneas O respecto de las L no se tradujo en aumentos en el rendimiento en ninguna de las densidades analizadas. En AD, no hubo diferencias de rendimiento entre las líneas L y O (Tabla 7). En BD, donde las líneas L rindieron más que las O, el mayor PUS de las líneas O respecto de las L no alcanzó para neutralizar el impacto que sobre el rendimiento tuvo el mayor NSS de las líneas L respecto de las O (4187 y 2983 para L y O, respectivamente, Tabla 7).

A su vez, para el PUS se encontró efecto de genotipo ($P < 0,0001$). La línea FV-15O fue la que presentó mayor peso unitario de semillas comparada con las otras tres líneas (172 mg; $P < 0,001$). A su vez, no se detectaron diferencias en peso para las líneas FV-15L y FV-9O (158 mg para ambas líneas). Por otro lado, estos dos genotipos difirieron significativamente con la línea FV-9L (144 mg; $P < 0,001$). Además, los pares de líneas FV-9 y FV-15 fueron comparados a través de contrastes. El par FV-15 presentó mayor peso unitario de semillas comparado con el par FV-9 (166 vs 151 mg, respectivamente, $P < 0,0001$).

En la partición a estructuras reproductivas, medida como el cociente entre el peso seco de las vainas sobre peso seco de la biomasa aérea total a cosecha, solo se observó efecto de forma de hoja. Las líneas L presentaron mayores valores de partición comparadas con las O (0,71 y 0,69, para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,01$, Exp. 13/14; y 0,67 y 0,64, para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,01$, Exp. 14/15).

El IC fue mayor en las líneas L respecto de las O para los dos pares de líneas analizadas, en las dos densidades y en los dos experimentos. Sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas en el Exp. 13/14 en AD y en el Exp. 14/15 en BD. En el Exp 13/14, en AD, los valores de IC fueron de 0,53 y 0,51 para las líneas L y O, respectivamente ($P < 0,05$), y en BD, fueron de 0,55 y 0,52, para las líneas L y O, respectivamente ($P = 0,24$). En el Exp. 14/15, en AD, los valores de IC fueron de 0,49 y 0,48 para las líneas L y O, respectivamente ($P = 0,69$), y en BD fueron de 0,51 y 0,50, para las líneas L y O, respectivamente ($P < 0,10$).

Tabla 7. Número de vainas a madurez (NVS), abscisión de vainas, número promedio de semillas por vaina (NPSV), número promedio de semillas desarrolladas por vaina (NPSV_D), aborto de semillas, número de semillas totales (NSS), peso unitario de semillas (PUS) y rendimiento para el estadio R8 (madurez de cosecha), para las líneas FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O sembradas en baja (BD) y alta (AD) densidad para los Exp. 13/14 y Exp. 14/15 combinados.

LÍNEAS	n° de vainas a madurez (NVS)		Abscisión de vainas		Semillas potenciales por vaina (NPSV)		Semillas desarrolladas por vaina (NPSV _D)		Aborto de semillas		n° de semillas (NSS)		Peso unitario de semillas (PUS)		Rendimiento	
	(n°.m ⁻²)		(%)		(n°.pod ⁻¹)		(n°.pod ⁻¹)		(%)		(n°.m ⁻²)		(mg)		(g.m ⁻²)	
	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
FV-9L	1552	1356	34	37	3,6	3,6	2,7	2,7	27	26	4131	3655	140	148	580	540
FV-9O	1419	1444	30	21	2,9	2,9	2,3	2,3	22	21	3210	3340	157	158	503	527
FV-15L	1567	1310	28	37	3,7	3,6	2,7	2,6	26	28	4242	3408	154	162	657	553
FV-15O	1215	1335	33	26	3,0	3,0	2,3	2,3	24	23	2757	3057	166	177	446	539
Media para forma de hoja (FH)																
L⁽¹⁾	1560 a ⁽⁴⁾	1333	31	37 a	3,6 a		2,7 a		27 a		4187 a	3532 a	151 b		618 a	546
O	1317 b	1390	31	23 b	2,9 b		2,3 b		22 b		2983 b	3199 b	164 a		481 b	533
Media para densidad (D)																
BD⁽²⁾	1438		31		3,3		2,5		25		3587		155 b		550	
AD	1361		30		3,3		2,5		24		3365		161 a		540	
ANVA⁽³⁾																
L vs. O	** ⁽⁵⁾		**		***		***		***		****		****		****	
BD vs. AD	*		ns		ns		ns		ns		**		***		ns	
FH x D	***		**		ns		ns		ns		****		ns		***	

(1) L y O, indican lanceolada y oblonga, respectivamente.

(2) BD y AD, indican baja y alta densidad, respectivamente.

(3) ANVA: análisis de la variancia.

(4) Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos según test de LSD ($P < 0,05$).

(5) *, **, ***, **** indican diferencias significativas al 0,1, 0,05, 0,01 y 0,001 nivel de probabilidad, respectivamente, y ns, diferencias no significativa, para el ANVA.

Relación entre el número de semillas por unidad de superficie (NSS) y sus componentes, número de vainas por unidad de superficie (NVS) y número promedio de semillas desarrolladas por vaina (NPSV_D)

Las variaciones en el NSS estuvieron altamente asociadas con las variaciones en el NVS, y la relación entre ambas variables se ajustó a una función lineal y directa, tanto para las líneas L como para las O. Sin embargo, el conjunto de puntos correspondiente a las líneas L se separó claramente del conjunto de puntos correspondiente a las líneas O, siendo los valores de la recta de ajuste de las líneas L significativamente mayores que los de la recta de ajuste de las líneas O ($P < 0,0001$, Figura 10). Las diferencias entre las rectas de ajuste que representan a las líneas L y las líneas O se mantuvieron para todo el rango de NVS generado en ambas densidades de siembra y en ambos experimentos (Figura 10). Esta diferencia se explica por el mayor NPSV_D de las líneas L respecto de las O (2,7 y 2,3 para L y O, respectivamente, Tabla 7). La diferencia en el NPSV_D entre L y O ocasionó que, a igualdad en el NVS, las líneas L tuvieron siempre unas 560 semillas más que las líneas O.

Por otra parte, para el NVS se obtuvieron valores máximos y mínimos de 1132-1821 (rango: 689 vainas) y 1062-1725 (rango: 663 vainas), para las líneas L y O, respectivamente, lo que determinó que el promedio de NVS de las líneas L fuera mayor que el de las O (1447 y 1354 vainas para L y O, respectivamente) (Figura 10, líneas punteadas verticales que cortan el eje de las abscisas). La diferencia entre los valores promedio del NVS de L y O representa el efecto que sobre este componente tuvo la morfología foliar, mientras que el rango en el NVS generado por las distintas combinaciones de experimentos y densidades analizados representa el efecto del ambiente sobre el componente NVS.

El incremento en el promedio de NVS (Figura 10, flecha roja horizontal), más el incremento en el NPSV_D (Figura 10, flecha roja vertical) que mostraron las líneas L respecto de las O, explica el aumento promedio en el NSS observado en las líneas L (3866 semillas) respecto de las O (3091 semillas) (Figura 10, líneas punteadas horizontales que cortan el eje de las ordenadas).

Un resultado adicional fue que, en el caso de las líneas L, los puntos correspondientes a situaciones de BD estuvieron llamativamente por encima del promedio (Fig. 10 cuadrados vacíos); mientras que en AD, con pocas excepciones, la mayoría de los puntos estuvieron por debajo del promedio (Fig. 10, cuadrados llenos).

Por el contrario, en el caso de las líneas O no se pudo distinguir ningún agrupamiento en función de la densidad (Fig. 10, círculos vacíos y llenos).

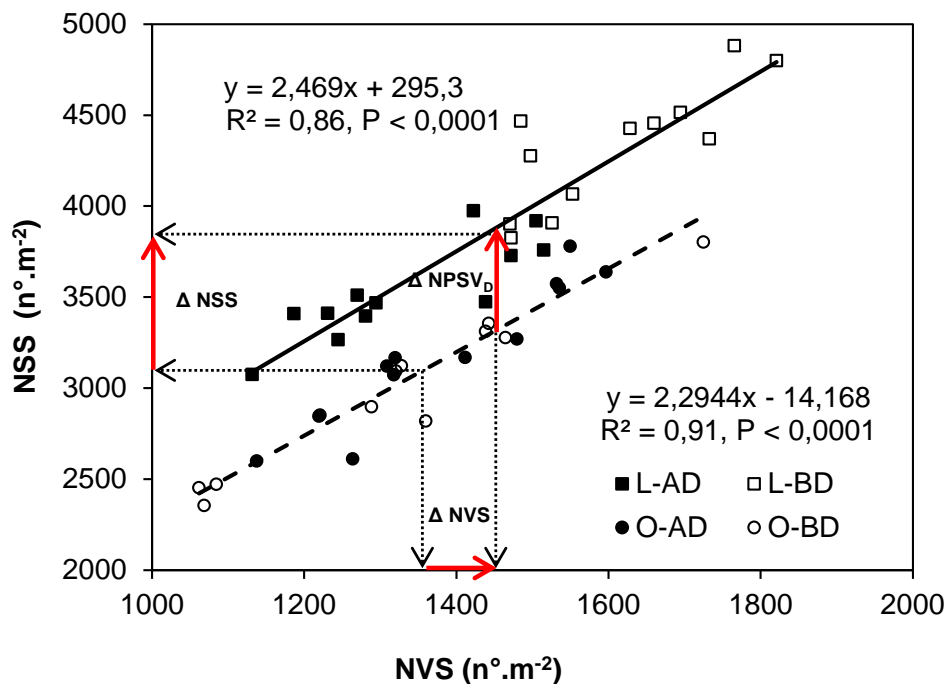


Figura 10. Número de semillas, NSS, en función del número de vainas, NVS, por unidad de superficie del cultivo a madurez de cosecha, para las líneas lanceoladas (L, símbolos cuadrados) y líneas oblongas (O, símbolos circulares), sembradas en baja densidad (BD, símbolos vacíos) y alta densidad (AD, símbolos llenos) para los Exp. 13/14 y Exp. 14/15. El trazo continuo (ecuación superior) y el trazo discontinuo (ecuación inferior) representan las funciones ajustadas para las líneas L y O, respectivamente. Δ NSS, Δ número promedio de semillas por vaina desarrolladas, NPSV_D, y Δ NVS, representan las diferencias entre los promedios de las líneas L y O, para NSS, NPSV_D y NVS, respectivamente.

I.5. DISCUSIÓN:

Efectos de la morfología foliar sobre parámetros de crecimiento y el ambiente lumínico de los canopeos

El menor IAF que presentaron las líneas L respecto de las O coincide con lo informado en trabajos previos donde se compararon pares de isolíneas L y O (Haile et al., 1998; Hicks et al., 1968; Rotzler et al. 2009), aunque estos autores no evaluaron en sus estudios los efectos del cambio en la morfología foliar sobre la ERI y la TAN.

En este estudio se constató que, aunque los pares de líneas L tuvieron menores valores de IAF que las líneas O, la RI fue similar en ambas morfologías foliares por lo que las líneas L tuvieron mayor ERI respecto de las líneas O durante la etapa vegetativa (Tabla 3). A su vez, para esa misma etapa, las TCC fueron similares para las líneas L y O, a pesar del menor IAF de las primeras. Los menores valores de IAF de los genotipos L fueron compensados por un incremento en la TAN, principalmente en el Exp. 13/14. Este aumento en la TAN en las líneas L respecto de las O durante la etapa vegetativa pudo estar relacionado con la mayor disponibilidad de RFA en las hojas de los estratos medios e inferiores del canopeo. La RFA disponible en los estratos medios del canopeo en las etapas vegetativa y reproductiva temprana (V7-ICLS) fue siempre mayor en los canopeos L que en los O, acentuándose estas diferencias en condiciones de BD respecto de AD (Figura 6). Resultados similares fueron obtenidos por Haile et al. (1998), Hicks et al. (1969) y Rotzler et al. (2009). Quijano (2015) también informó incrementos en la TAN como consecuencia de reducciones en el IAF provocados por defoliaciones. Los resultados de estos autores, así como los resultados de este Capítulo, obtenidos para canopeos con diferente morfología foliar, sugieren que el potencial fotosintético de las hojas de los estratos inferiores del canopeo de soja se encuentra sub-utilizado en canopeos densos o muy desarrollados, debido al sombreado de las hojas inferiores por parte de las hojas superiores.

A su vez, los mayores valores de TAN que presentaron los genotipos L respecto de los O durante la etapa vegetativa podrían deberse a una mejor distribución de la RFA dentro del canopeo como fuera sugerido por Egli et al. (1970) o a una mayor tasa fotosintética debida a una mayor actividad de la enzima Rubisco y a un mayor contenido de cloroplastos por unidad de área foliar como sugirieron Sung y Chen (1989). Alternativamente, dado que los mayores valores de TAN se obtuvieron con menores IAF, una tercera opción es que la mayor TAN observada en las líneas L respecto de las O haya estado relacionada con la mayor ERI de las primeras respecto de las segundas. Relacionado con lo anterior, cabe

señalar que Board (2000) y Carpenter y Board (1997) reportaron que los mayores valores de TAN observados en baja densidad, respecto de alta densidad, se debieron a la mayor ERI de las plantas creciendo en baja densidad durante la etapa vegetativa. Los resultados presentados en este Capítulo sobre el efecto de la morfología foliar sobre la eficiencia de captación de RFA durante la etapa vegetativa, previo al cierre del canopeo y su posible relación con la TAN no han sido informados previamente en la literatura.

Durante el período de formación de vainas (R2-R5) el IAF estuvo por encima del crítico para las líneas L y O en ambos experimentos y en ambas densidades. Para ese mismo período, las TCC_{R2-R5} promedio estuvieron por encima de los $20,0 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, en ambas morfologías foliares por lo que no se consideraron limitantes en ningún caso para el establecimiento de las estructuras reproductivas. Al respecto, Quijano et al. (1998) encontraron que si bien la relación lineal y directa entre el número de semillas y la $TCC_{(R2-R5)}$ se manifestaba para un rango de TCC de $7,9$ a $13,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, con TCC de $13,8$ a $19,7 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ (diferentes entre sí, $P < 0,05$) el n° de semillas se mantuvo constante, sugiriendo que con $TCC > 14 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ otro/s factor/es controlan el número de semillas en canopeos de soja.

Los altos valores de $TCC_{(R2-R5)}$ observados, tanto para las líneas L como para las O, durante el período de establecimiento de vainas posiblemente se debieron a que las líneas utilizadas en este estudio pertenecen al grupo de madurez V largo. Estos grupos, sembrados en la latitud donde se realizaron los ensayos de campo de esta Tesis ($33^{\circ} 01' \text{ S}$) creciendo sin restricciones en los principales factores ambientales (Anexo, Figura suplementaria 1) generaron canopeos con un gran desarrollo del IAF y con altas $TCC_{(R2-R5)}$ (Figura 4 y Tabla 4, respectivamente).

El cambio en la estructura del canopeo, generado por la modificación de la morfología foliar, no solo produjo variaciones en la cantidad de RFA en los estratos medios del canopeo (Figura 6) sino que además modificó la relación R/RL en su interior (Figura 5). Durante el período V7-ICLS la línea FV-15L presentó mayores valores de R/RL que la línea FV-15O, encontrándose las mayores diferencias en BD. Trabajos previos informaron que cambios en la densidad y en el espaciamiento entre surcos, modifican el IAF del cultivo, impactando tanto en la relación R/RL en el interior del canopeo como así también en la RI (Board, 2000; Kasperbauer, 1987; Toyota et al., 2017). Sin embargo, en ninguno de esos trabajos se compararon canopeos con distinta forma de hoja. Los resultados informados en esta Tesis, respecto de la dinámica de los cambios en la relación R/RL (Figura 5 A y B) y la evolución en la penetración de RFA (Figura 6 A y B) son consistentes con los informados en la literatura para los efectos de la densidad pero novedosos en lo referido al efecto que

genera la modificación de la morfología foliar (i.e. canopeos lanceolados vs oblongos) sobre la cantidad y calidad de la luz en el interior de los canopeos.

Estos resultados son la primera evidencia experimental de que cambios en la morfología foliar modifican el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico dentro de canopeos de soja.

Adicionalmente, cuando se comparó la evolución de la RI y de la relación R/RL ante cambios en el IAF se observó que las respectivas curvas mostraron patrones muy diferentes (Figura 11). Incrementos del IAF de 3 a 8 aumentaron un 7 % la RI, al tiempo que disminuyeron un 60 % la relación R/RL. Si bien $IAF > IAF_c$ no generan grandes cambios en la RI, y por consiguiente en la TCC, por encima del IAF_c se continúa modificando marcadamente la relación R/RL. Estos resultados indican que el rango de respuesta de la relación R/RL ante variaciones en el IAF es mucho mayor que para la RI (Figura 11). Más importante aún es el hecho de que la asociación observada entre la relación R/RL y la iniciación de vainas fue lineal y directa en un rango que va desde 0,23 a 0,53 (Figura 9), que corresponden aprox. a IAF de 8 y 3, respectivamente (Figura 11). Esto indica que la asociación entre vainas iniciadas y la relación R/RL no solo se manifiesta en canopeos abiertos sino que la misma continúa operando aún en canopeos considerados como completamente cerrados. Dicho en otras palabras, la calidad del ambiente lumínico en el interior de los canopeos, medida como los cambios en la relación R/RL, y sus efectos fotomorfogénicos sobre fenómenos del desarrollo, como la iniciación de vainas, opera tanto por encima como por debajo del IAF_c .

En este contexto, desde el punto de vista del manejo de los cultivos, es importante considerar que canopeos con elevados valores de IAF, generados por la utilización de genotipos con folíolos oblongos y/o altas densidades de siembra permiten que rápidamente se logre interceptar el 95 % de la radiación incidente y con ello maximizar la TCC. Sin embargo, valores elevados de IAF durante la etapa reproductiva temprana (R2-R5) producen una considerable reducción en la relación R/RL, que impacta negativamente sobre la iniciación de vainas, lo que podría limitar el potencial de rendimiento del cultivo.

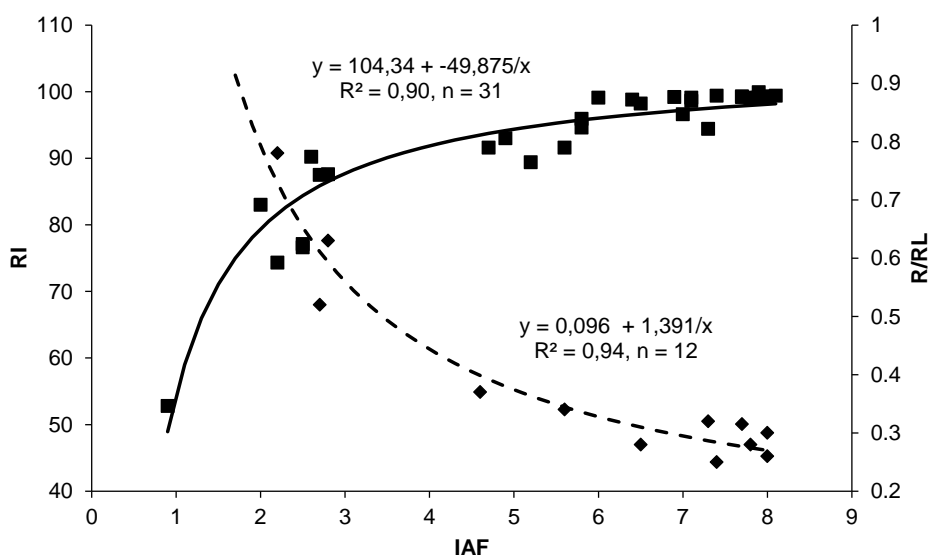


Figura 11. Evolución del porcentaje de radiación interceptada (RI) en función del índice de área foliar (IAF) para los pares de líneas FV-9L/FV-9O y FV-15L/FV15-O, en alta y baja densidad de siembra, en los Exp.1 y Exp.2 (cuadrados) y evolución de la relación rojo/rojo lejano R/RL en el interior del canopeo en función del IAF para el par de líneas FV-15L/FV15-O, en alta y baja densidad de siembra, en el Exp.14/15 (rombos). La línea continua (ecuación superior) y la línea discontinua (ecuación inferior) indican las funciones ajustadas para la RI y la relación R/RL, respectivamente.

Efectos de la morfología foliar sobre la iniciación de vainas

Las líneas L presentaron siempre mayor número de vainas iniciadas comparadas con las líneas O (Tablas 5 A y 5 B). A su vez, las variaciones observadas en el número de vainas iniciadas estuvieron principalmente asociadas con cambios en el número de vainas de las ramificaciones (Figura 7).

Quijano y Morandi (2011) y Quijano (2015) informaron que los cambios generados en la estructura del canopeo mediante defoliaciones artificiales, aumentaron el número de vainas iniciadas debido al aumento en el número de vainas en las ramificaciones, como consecuencia de un mayor número de nudos reproductivos por cada ramificación, sin producir cambios en el número de ramificaciones. De manera similar, en esta Tesis tampoco se registraron cambios en el número de ramificaciones, y el mayor número de vainas iniciadas también se explicó por el mayor número de vainas en las ramificaciones producto de un mayor número de nudos reproductivos de las ramificaciones, así como de más vainas iniciadas por nudo reproductivo (Figura 7).

Respecto del efecto de la relación R/RL sobre las ramificaciones, en un trabajo reciente Toyota et al. (2017) mencionaron que no encontraron relación entre el número de

ramificaciones y la relación R/RL en dos variedades de soja japonesas de crecimiento determinado, creciendo en dos densidades durante dos campañas. Dado que estos autores midieron la relación R/RL a nivel del suelo, a intervalos semanales, durante el ciclo del cultivo, así como los cambios en distintos niveles del canopeo, una vez en cada estación de crecimiento, es necesario discutir sus resultados con mayor detalle. Lamentablemente Toyota et al. (2017) solo informaron el número de ramificaciones por planta (ram/pl) pero no cuantificaron ni el número de nudos de las ramificaciones, ni el número de nudos reproductivos, ni el número de vainas de las ramificaciones, ni tampoco mencionan ningún otro componente del rendimiento, ni los rendimientos obtenidos, con lo cual es imposible establecer comparaciones o saber cual podría ser el impacto de sus resultados en la productividad de un cultivo. No obstante, y respecto del componente medido por estos autores (i.e. número de ramificaciones) es necesario remarcar que, tal como se mencionó en el párrafo anterior, tanto en los trabajos de Quijano y Morandi (2011) y Quijano (2014), como en los resultados de esta Tesis, el aumento en el número de vainas por unidad de superficie del cultivo asociado al aumento en la relación R/RL no ocurrió debido a cambios en el número de las ramificaciones. En el caso de Quijano y Morandi (2011) y Quijano (2014), el aumento en el número de vainas por unidad de superficie del cultivo estuvo asociado solo al aumento en el número de nudos reproductivos de cada ramificación, mientras que en esta Tesis, no solo se observó un aumento en los nudos reproductivos por ramificación (similar a lo observado por Quijano y Morandi, 2011), sino que además se modificó el número de vainas por nudo reproductivo de las ramificaciones.

Cuando se analizaron las posibles causas de la variación en la iniciación de vainas se observó que, no obstante las diferencias en IAF, tanto en las líneas L como en las O el número de vainas iniciadas estuvo inversamente relacionado con el IAF promedio del período V5-R5 (Exp. 13/14) y V7-R5 (Exp. 14/15) (Figura 8). Mientras que no se encontró asociación entre las vainas iniciadas y la TCC_{R2-R5} . Estos resultados indicarían que, con elevados valores de TCC_{R2-R5} , como los obtenidos en los experimentos informados en esta Tesis, la asociación lineal y directa entre el número de vainas y la TCC_{R2-R5} observada por otros autores (Board y Harville 1994; Egli y Zhen-wen, 1991; Vega et al., 2001) no se cumple, sugiriendo que otros factores estarían regulando la iniciación de vainas en soja en estas condiciones.

Por otro lado, cuando se relacionaron las vainas iniciadas con los niveles de R/RL en el interior del canopeo se pudo observar una asociación lineal y directa entre las variaciones en el número de vainas iniciadas y los cambios en la relación R/RL en el interior del canopeo (Figura 9). Además, los mayores niveles de R/RL y de vainas iniciadas se observaron en las

líneas L comparadas con las líneas O. Quijano (2014) obtuvo resultados similares utilizando defoliaciones aplicadas en floración. En su trabajo encontró que el número de vainas a cosecha estuvo directamente asociado con la relación R/RL durante el período de establecimiento de las vainas (R2-R5). Este autor también encontró que el número de vainas iniciadas estuvo inversamente relacionado con el IAF y la RI y no mostró asociación con la TCC_{R2-R5} .

En este trabajo se extendió el período medido incluyendo parte de la etapa vegetativa (desde V7 hasta ICLS) (Figura 5), ampliando el rango de respuesta de la relación R/RL a la etapa vegetativa, lo que podría haber influido en el número de nudos de las ramificaciones que se forman antes de R2. Al respecto, Board (2000) también relacionó el crecimiento de las ramificaciones en distintas densidades con cambios en la relación R/RL durante la etapa vegetativa, sugiriendo que las diferencias en la relación R/RL observadas antes de R1 explicaban el crecimiento de las ramificaciones ocurrido después de R1.

El hecho de que la iniciación de vainas no haya estado relacionado con la disponibilidad de asimilados ha sido también observado por otros autores en trabajos recientes. Nico et al. (2015) sugirieron que plantas de soja expuestas a días largos durante el período de pos-floración aumentan el número de vainas por nudo, a partir de la disminución de la competencia entre vainas de distinta jerarquía. En dicho estudio, se evidenció un proceso intra-nodal que fue independiente de los asimilados, en el cual el fotoperíodo, específicamente los días largos, generaron un retraso en la elongación y en el activo crecimiento de las vainas dominantes, permitiendo que se pudieran fijar vainas en posiciones que en general están dominadas (racimos laterales).

En esta Tesis también se observó un aumento en el número de vainas iniciadas por nudo reproductivo (VI/NR) en los casos de máxima apertura del canopeo (i.e. canopeos L en BD, Tablas 5 A y 5 B). Sin embargo, dado que en este estudio no se realizó el seguimiento de la evolución de las vainas en cada nudo, no es posible discernir si el mayor número de VI/NR se debió a una menor abscisión, a la disminución de la competencia entre vainas de distinta jerarquía o a la combinación de ambas. No obstante, a la luz de los resultados discutidos en los párrafos anteriores, y teniendo en cuenta los diversos factores que regulan el desarrollo de las estructuras reproductivas en soja, es posible hipotetizar que el mayor número de vainas iniciadas por nudo reproductivo en las líneas L respecto de las O y en BD respecto de AD, observados en este estudio haya estado relacionado con un proceso intra-nodal desencadenado por señales fotomorfogénicas, más específicamente por niveles más altos de R/RL. Poner a prueba esta hipótesis requiere del diseño de nuevos experimentos.

En este contexto, es necesario mencionar que la evidencia experimental disponible hasta el momento es de tipo correlativa y por ende, comprobar si estas asociaciones responden a una la relación causal requiere una aproximación experimental distinta a la utilizada en esta Tesis. Pese a ello, los resultados de este estudio, en lo referido al efecto de la apertura del canopeo sobre el número de vainas iniciadas, obtenido utilizando líneas con distinta morfología foliar, son coincidentes con los obtenidos por Quijano y Morandi (2011) y Quijano (2014) utilizando defoliaciones artificiales. Por lo tanto, tomados en conjunto, estos resultados soportan la hipótesis de que las señales fotomorfogénicas (específicamente la relación R/RL) desempeñan un rol importante en la iniciación de vainas en soja.

Al respecto Quijano (2014) propuso un nuevo marco conceptual para lograr una mejor comprensión de la relación entre la disponibilidad de asimilados (estimada como TCC_{R2-R5}), la radiación fotomorfogénica y el número de vainas en canopeos de soja, basado en el establecimiento de distintos escenarios. Cada escenario se define por: i) la TCC_{R2-R5} mínima ($TCC_{R2-R5min}$) y ii) la calidad del ambiente lumínico prevaleciente en el interior del canopeo. La $TCCmin$ entre R2 y R5 para lograr niveles máximos de vainas fue estimada por Board y Harville (1994) en $15 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, y por Quijano et al. (1998) en $14 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

Escenario I: La $TCC_{R2-R5min}$ necesaria no es alcanzada en algún momento durante el período de establecimiento de las estructuras reproductivas, lo que produce la reducción numérica del/los componente/s del rendimiento afectado/s.

Escenario II: La $TCC_{R2-R5} \geq TCC_{R2-R5min}$ durante todo el período de establecimiento de las estructuras reproductivas, pero la distribución espectral de la radiación fotomorfogénica (principalmente longitudes de onda correspondientes al R, el RL y el Azul) dentro del canopeo es limitante para lograr la máxima expresión de los componentes numéricos.

Escenario III: La $TCC_{R2-R5} \geq TCC_{R2-R5min}$ durante todo el período de establecimiento de las estructuras reproductivas, y la distribución espectral de la radiación fotomorfogénica dentro del canopeo no es limitante para lograr la máxima expresión de los componentes numéricos (En esta Tesis los cambios en la radiación fotomorfogénica se expresaron a través de los cambios en la relación R/RL).

Los modelos que explican las variaciones del número estructuras reproductivas en función de la TCC_{R2-R5} , como el desarrollado por Egli y Zhen-wen (1991), resultan válidos en un escenario I. En ese escenario las variaciones de los componentes numéricos se encuentran directamente relacionadas con la TCC_{R2-R5} . Por el contrario, en los escenarios II y III la TCC_{R2-R5} no sería limitante y la radiación fotomorfogénica regularía la expresión de los distintos componentes numéricos que determinan el número estructuras reproductivas. En el

escenario II la TCC no impone restricciones a los componentes numéricos, pero el ambiente lumínico sería inapropiado. En el escenario III ni la TCC ni el ambiente lumínico resultarían limitantes, lo que permitiría la expresión del máximo potencial para el establecimiento de las estructuras reproductivas.

Utilizando este marco conceptual para la interpretación de los resultados de esta Tesis, se puede descartar que el cultivo haya estado en un escenario I, ya que las TCC_{R2-R5} en todos los casos superaron holgadamente los mínimos establecidos por Board y Harville (1994) y por Quijano et al., (1998) (Tabla 4).

Por lo tanto las situaciones encontradas en los experimentos de esta Tesis estarían dentro de los escenarios II o III. En particular, los resultados obtenidos en los casos de canopeos densos, como los de las líneas O, en ambas densidades, y las líneas L en alta densidad, se explicarían en el marco de un escenario II (sin limitantes por asimilados pero con limitantes en la radiación fotomorfogénica), mientras que los resultados de las líneas L en baja densidad se explicarían en el marco de un escenario III (sin limitantes ni en la cantidad de asimilados ni en la calidad del ambiente lumínico) lo que les permitió llegar con el mayor número de vainas a cosecha (Tabla 7).

Efectos de la morfología foliar sobre la relación destino-fuente y partición en R5

Para los dos experimentos analizados las líneas L presentaron mayor relación destino-fuente que las líneas O (Tabla 6). Esto se debió a la combinación del mayor número de vainas iniciadas en L respecto de O (Tablas 5 A y 5 B) y al menor IAF de las líneas L respecto de las O durante el período de formación de las vainas (Tabla 4).

Estos cambios en la relación destino-fuente, como consecuencia del mayor número de vainas iniciadas en las líneas L, podrían ser la causa de las diferencias en partición a dicho componente observadas en R5.

Relacionado con esto último, en algunos trabajos se ha observado como cambios en la actividad de los destinos modifican la partición a estructuras reproductivas. Myers et al. (1987) en experimentos con luz suplementaria, observaron que altos valores de R/RL percibidos por los racimos de las flores incrementaron la intensidad y la fuerza de los destinos, aumentando el movimiento de sacarosa a estructuras reproductivas. En concordancia con este trabajo, Heindl y Brun (1983) también observaron una reducción del 30 % en la acumulación de ^{14}C en flores y vainas que fueron sombreadas, a raíz de una menor actividad de los destinos.

Por otra parte, cambios en la densidad de siembra también modificaron los patrones de partición de asimilados entre los tallos principales y las ramificaciones. En BD, se observó mayor partición a ramificaciones mientras que en AD, la partición fue mayor hacia los tallos principales. Las diferencias detectadas en partición de materia seca ante cambios en la densidad podrían haber estado relacionadas con variaciones en la relación R/RL en el interior de los canopeos. En BD durante la etapa vegetativa, los valores de R/RL promedio para las dos morfologías foliares fueron un 21 % mayor comparados con la AD. Resultados similares fueron informados por Kasperbauer (1987) y por Board (2000).

Rendimiento: componentes y su relación con la morfología foliar

Los dos componentes numéricos principales que determinan el rendimiento a cosecha en soja son el NSS y el PUS. El primero es el que mejor explica las variaciones que se observan en el rendimiento. Esta afirmación no solo coincide con los resultados presentados en este Capítulo sino que además es avalada por numerosos trabajos (Board y Modali, 2005; Board y Maricherla, 2008; Calvino et al., 2003; Kokubun y Watanabe, 1983; Shibles et al., 1975).

A su vez, el NSS es el resultado del NVS y del NPSV_D. El NVS es un componente muy afectado por el ambiente. Esto fue corroborado a partir de las variaciones producidas sobre el NVS por la forma de hoja y la densidad (Tabla 7, Figura 10). En cambio, el NPSV_D así como el PUS no presentaron variaciones entre experimentos ni debidas a la interacción forma de hoja por densidad. Esto indica que en nuestras condiciones ambos componentes se mantuvieron más estables. Resultados similares han sido observados por otros autores (Board y Harville, 1998; Brim, 1972; Egli, 1998; Hanson, 1986; Quijano y Morandi, 2011; Shibles et al. 1975).

El NVS es consecuencia del balance entre dos procesos: la iniciación de vainas y la abscisión de las mismas. En los experimentos analizados en este Capítulo, los mayores valores de vainas iniciadas se lograron en las líneas L independientemente de la densidad utilizada (Tablas 5 A y 5 B). Este mayor potencial de las líneas L respecto de las O solo fue capitalizado a cosecha en BD. Las diferencias en el número de vainas que llegaron a madurez entre las líneas L y O en ambas densidades estuvieron asociadas con el porcentaje de abscisión. La abscisión fue mayor en los genotipos L comparados con los O en AD. En cambio en BD no se detectaron diferencias entre ambas morfologías foliares (Tabla 7).

La abscisión es un proceso complejo que puede involucrar distintos factores los cuales a su vez, pueden interactuar entre sí. Algunos autores han sugerido que la abscisión podría estar relacionada con la competencia por asimilados entre los distintos órganos que están creciendo (Johnston et al., 1969; Schou et al., 1978 y Van Doorn, 2002). Otros, han indicado que podría estar relacionada con los niveles de R/RL en el interior del canopeo. Heindl y Brun (1983), aplicando luz blanca y luz roja en la parte inferior del canopeo, observaron que la abscisión de vainas se reducía, incrementando el número de vainas por nudo a cosecha, sin modificar ni el peso de las semillas ni el número de semillas por vaina. Adicionalmente, Myers et al. (1987) propusieron al fitocromo, presente en los racimos, como posible fotorreceptor involucrado en la regulación de la abscisión de las estructuras reproductivas en soja. La abscisión es un proceso fisiológico activo, que ocurre en la zona de abscisión, compuesta por unas pocas hileras de células diferenciadas ubicadas perpendicularmente al eje del pedicelo y está hormonalmente regulada por el balance entre auxinas, citocininas y etileno (Kokubun, 2011). El etileno, como muchas hormonas vegetales, vincula estímulos externos con eventos específicos del desarrollo de las plantas. Pierik et al. (2004) informaron que plantas de tabaco transgénicas insensibles al etileno mostraron una menor respuesta de escape al sombreado cuando fueron sometidas a bajos niveles de R/RL, comparadas con plantas normales.

Con los datos disponibles en este estudio no fue posible precisar con exactitud las causas que determinaron las diferencias en los porcentajes de abscisión en AD. No obstante, podría especularse que en AD la relación R/RL es más baja lo que estimularía la síntesis de etileno ya que existen evidencias que la producción de etileno es estimulada por una baja relación R/RL (Pierik et al., 2004). La síntesis de etileno puede incluso producirse sin que se registren cambios en la calidad de luz, ya que el etileno también puede actuar como una señal primaria de la presencia de vecinos (Pierik et al., 2004). Por lo tanto, sería esperable encontrar mayores concentraciones de etileno en los canopeos de cultivos con altas densidades de plantas. A su vez, mayores concentraciones de etileno inducirían mayores niveles de abscisión de vainas. Esto explicaría porque el efecto positivo inicial sobre el incremento en la iniciación de vainas en las líneas L (Tablas 5 A y 5 B), fue anulado luego, en el tratamiento de AD, por un alto nivel de abscisión, cosa que no sucedió con las líneas L en BD.

Además, si bien no se cuenta con evidencia experimental, es posible que los genotipos L presenten distinta sensibilidad ante cambios en la densidad de siembra comparados con los genotipos O. Estas diferencias en sensibilidad pueden haber influido en los niveles de abscisión observados en las distintas líneas evaluadas. Relacionado con esto

último, Wiebold (1981) comparando diferentes cultivares de soja encontró diferencias genotípicas en los porcentajes de abscisión de vainas.

El otro componente que determina el NSS es el $NPSV_D$. Este componente es función de la relación entre el NPSV y el porcentaje de aborto de semillas. Las líneas L utilizadas en esta Tesis presentaban mayor NPSV comparadas con las líneas O (Tabla 2). A su vez, las líneas L presentaron mayor aborto de semillas que las líneas O, no obstante esto, el mayor NPSV se tradujo en un mayor $NPSV_D$, en las primeras respecto de las segundas, contribuyendo al aumento en el NSS (Tabla 7).

El $NPSV_D$ se mantuvo estable frente a las variaciones en el número de vainas a cosecha (Figura 10). La estabilidad que presentó este carácter determinó que para cualquier NVS considerado, el NSS fuese siempre mayor en las líneas L que en las líneas O (Figura 10). Estos resultados son consistentes con el hecho de que el NPSV es una característica genética con alta heredabilidad (ver Capítulo II, Sección 2 de esta Tesis) mientras que el número de vainas es un componente muy susceptible a cambios en las condiciones ambientales, como por ejemplo los generados por cambios en la densidad discutidos arriba.

Los resultados presentados en este Capítulo en relación con el NVS y el NPSV demuestran claramente que no existe compensación entre ambos componentes. Similares resultados fueron observados por Board y Maricherla (2008). Por otra parte, el incremento en el promedio de NVS, sumado al incremento en el $NPSV_D$ que mostraron las líneas L respecto de las O, explica el aumento promedio en el NSS observado en las líneas L respecto de las O (Figura 10).

Si bien el PUS no fue el foco principal de esta investigación, su importancia como componente del rendimiento, así como las posibles interacciones con los otros dos componentes numéricos estudiados y las diferencias genéticas existentes en el PUS de las líneas utilizadas en este trabajo, hacen necesario tomarlo en consideración.

Para los dos pares de líneas utilizadas, los genotipos L presentaban menor peso potencial comparados con los genotipos O. El PUS es función de la tasa de crecimiento individual de las semillas ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) y de la duración del período efectivo de llenado (Van Roekel, et al., 2015). Dado que no se detectaron diferencias en la duración del período de llenado entre ambas morfologías foliares y para los dos pares de líneas, las variaciones observadas en el peso unitario estuvieron asociadas con la tasa de crecimiento individual de las semillas. Las líneas L presentaron en promedio menores tasas de crecimiento de semillas en relación con las O ($5,9$ y $7,4 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$, para las líneas L y O, respectivamente, $P < 0,001$).

Por otra parte, cuando se compararon individualmente las cuatro líneas utilizadas en esta Tesis (FV-9L, FV-9O, FV-15L y FV-15O) se pudo observar que, tanto los genotipos L como los O mostraron variabilidad en el PUS. De hecho, para este carácter se encontraron diferencias significativas entre los dos genotipos O y los dos L. A su vez, FV-9O y FV-15L, que se caracterizaban por tener distinta forma de hoja y NPSV, presentaron pesos unitarios similares (Tabla 7). Esto último sugiere que incrementos en el NPSV no necesariamente tienen que estar asociados a reducciones en el PUS.

En AD, si bien las líneas L presentaron mayor NSS, el cual se debió fundamentalmente a un incremento en el NPSV_D, el menor peso potencial de las mismas determinó que a cosecha no se lograran evidenciar diferencias significativas en rendimiento entre las dos morfologías foliares. A pesar de ello, en BD, si bien los genotipos lanceolados también tuvieron menor peso unitario de semillas comparados con los genotipos oblongos, el mayor NSS logrado por las líneas L a partir de la combinación de un mayor NVS y de NPSV_D les permitió obtener para esa densidad rendimientos superiores en relación a las líneas O (Tabla 7).

Por último, en todos los trabajos que se han presentado hasta el momento en los que se han comparado pares de isolíneas lanceoladas y oblongas no se observaron diferencias en rendimiento entre ambas morfologías foliares. Esto ha llevado a los autores a concluir que la incorporación del carácter forma de hoja lanceolada no generaría ninguna ventaja adicional que justificara su incorporación en los programas de mejoramiento (Hicks et al., 1969; Hiebsch et al., 1976; Jain y Singh, 1978; Mandl y Buss, 1980; Rotzler et al., 2009).

Sin embargo, los resultados presentados en este Capítulo demuestran lo contrario. Las líneas L no solo presentaron mayor ERI y TAN durante el período vegetativo, sino que además, mejoraron la calidad del ambiente lumínico en el interior de sus canopeos. Mayores valores de R/RL fueron observados en las líneas L comparadas con las líneas O. Estos incrementos en la relación R/RL en las líneas L habrían estado asociados con el aumento en el número de vainas iniciadas en R5, manteniéndose la diferencia entre las dos morfologías foliares en BD hasta cosecha. Justamente en BD las líneas L superaron en rendimiento en un 28 % a las líneas O, (Tabla 7).

En este contexto es pertinente remarcar que en los trabajos previos (arriba mencionados) se utilizaron genotipos antiguos, que ya no son competitivos comercialmente, cuyos rendimientos promedio fueron de aprox. 2600 kg/ha (rango: 2100 a 3200 kg/ha), mientras que las líneas utilizadas en los experimentos de esta Tesis son genotipos modernos, con mucha mayor capacidad productiva, cuyo promedio de rendimiento fue de 5430 kg/ha (rango: 4460 a 6570 kg/ha) (Tabla 7). Relacionado con esto último, Cooper

(1975) sugirió que caracteres como la forma de hoja podrían no comportarse de manera similar en distintos fondos genéticos, y que es posible que requieran de un fondo genético (y condiciones de cultivo) adecuados para maximizar su potencial de rendimiento. A una conclusión similar arribaron recientemente Sayama et al. (2017).

I.6. CONCLUSIONES

Uno de resultados más destacados de este Capítulo fue que se mostró la primer evidencia experimental de que cambios en la morfología foliar modifican el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico dentro de canopeos de soja. Las líneas lanceoladas mostraron mayores niveles de R/RL en el interior del canopeo comparadas con las líneas oblongas durante la etapa vegetativa y reproductiva temprana. Además se demostró que las líneas con folíolos lanceolados mejoran la eficiencia de intercepción de la RFA (ERI) y de asimilación (TAN) comparadas con las líneas con folíolos oblongos durante la etapa vegetativa, previo al cierre del canopeo.

Otro resultado destacado fue que el número de vainas iniciadas en el estadio R5 estuvo directamente asociado con la relación R/RL en el interior del canopeo, inversamente relacionado con el IAF y con la RI y no mostró asociación con la TCC_{R2R5} . Por otro lado, las variaciones observadas en las vainas iniciadas estuvieron asociadas principalmente a variaciones en el número de vainas de las ramificaciones. Los resultados obtenidos no solo concuerdan con los de Quijano (2015), sino que además sustentan la hipótesis planteada inicialmente por el grupo de trabajo que postula que un efecto fotomorfogénico estaría regulando la iniciación de vainas en soja (Quijano y Morandi, 2011; Quijano, 2015).

En relación a los componentes numéricos del rendimiento, otro resultado notable de este Capítulo fue la demostración de que incrementos en el NPSV, logrados a partir de un mayor porcentaje de vainas de cuatro semillas, generaron un aumento directo en el número de semillas por unidad de superficie independientemente del número de vainas. Este aumento en el NPSV que presentaron las líneas lanceoladas, se mantuvo estable en los dos experimentos analizados y en las dos densidades de siembra, indicando la alta regulación genética que presenta dicho carácter.

CAPÍTULO II

ASPECTOS MOLECULARES DE LA INCORPORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS HOJA LANCEOLADA Y ALTO PORCENTAJE DE VAINAS DE CUATRO SEMILLAS A GERMOPLASMA ELITE DE SOJA

INTRODUCCIÓN GENERAL

Marcadores Genéticos. Concepto. Clasificación

Los marcadores genéticos son segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. A su vez, un marcador puede ser un gen o alguna sección de ADN sin función conocida. Los marcadores se usan como formas indirectas para rastrear el patrón hereditario de genes que aún no han sido identificados, pero cuyas ubicaciones aproximadas se conocen. El marcador ideal debería ser altamente polimórfico (dentro y entre especies), de herencia mendeliana no epistática, insensible a los efectos ambientales, codominante (capaz de diferenciar individuos heterocigotas de homocigotas), de rápida identificación y simple análisis, y de detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Echenique et al., 2004).

Los marcadores genéticos se pueden utilizar en distintos aspectos del mejoramiento de plantas tales como: estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; identificación de variedades, líneas puras e híbridos permitiendo la protección de los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas; establecimiento de relaciones de parentesco o "pedigree" entre líneas o variedades para realizar estudios genéticos; localización genética e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños afectando a caracteres cuantitativos (Echenique et al., 2004; Jonah et al., 2011).

Tipos de marcadores genéticos

Marcadores morfológicos

Son características fenotípicas de sencilla identificación visual tales como, forma de hoja, pubescencia, color de flor, de vaina, de hilo, etc. En todos los casos debe tratarse de caracteres de herencia monogénica y predecible según las leyes de Mendel. Los marcadores morfológicos fueron los primeros marcadores utilizados en el mejoramiento de plantas. Además, contribuyeron significativamente al desarrollo de los primeros mapas de ligamiento genéticos de especies de interés (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Jiang, 2013). Sin embargo, actualmente su uso es restringido ya que presentan las siguientes limitaciones: 1) se encuentran disponibles en un número restringido de especies vegetales, utilizadas como sistemas modelo para estudios genéticos, tales como el maíz, el tomate y la arveja, 2) presentan bajo nivel de polimorfismo y 3) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento (Echenique et al., 2004; Jiang, 2013).

Marcadores bioquímicos

Son polimorfismos presentes en ciertas proteínas detectados a través de técnicas bioquímicas. El desarrollo de los marcadores bioquímicos produjo una revolución en los estudios genéticos en plantas, que hasta el momento habían contado con un limitado número de marcadores morfológicos. Existen dos tipos de marcadores bioquímicos: las isoenzimas y las proteínas de reserva. Las *isoenzimas* son formas moleculares de una enzima, que poseen una actividad catalítica común, es decir, actúan sobre el mismo sustrato. Ciertos cambios en el ADN que codifica estas enzimas (mutaciones) pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos, originando proteínas con la misma actividad biológica pero con diferente carga neta y por lo tanto con diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico. Las *proteínas de reserva* son un grupo heterogéneo de proteínas presentes en las semillas de las plantas que tienen por función proveer nitrógeno y energía al embrión en los primeros estadios de crecimiento. Estas proteínas han sido extensamente estudiadas en cereales y oleaginosas y se relacionan directamente con la calidad del grano. Las proteínas de reserva se extraen mediante procedimientos sencillos a partir de las semillas y se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

El uso de estos marcadores estuvo limitado a especies agronómicas por su baja cantidad, y también porque los mismos están sujetos a la expresión tejido específico y modificaciones post-traduccionales, siendo no comparativos (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Jiang, 2013; Karp y Edwards, 1997).

Marcadores moleculares

Un marcador molecular (MM) es un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma, cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida.

Inicialmente se utilizaron enzimas de restricción que permitieron el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción del ADN utilizando la hibridación con sondas. Posteriormente, el desarrollo del método de amplificación en cadena de fragmentos de ADN utilizando la enzima ADN Polimerasa (Técnica de PCR, acrónimo del inglés: Polymerase Chain Reaction, “reacción en cadena de la polimerasa”), llevó a la descripción de otra clase de marcadores moleculares que utilizan esta técnica de amplificación de una secuencia específica o varios loci a la vez (Kochert, 1994).

Algunas de las ventajas que presentan los MM, respecto de los morfológicos y bioquímicos es que no presentan influencia ambiental y son fenotípicamente neutros; son potencialmente ilimitados; tienen una amplia cobertura del genoma; alto nivel de polimorfismo; alto contenido de información genética (codominantes); permiten el análisis en fases tempranas y son sencillos, rápidos y objetivos (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Jiang, 2013).

Los MM se pueden clasificar en base a la metodología empleada en su detección. Algunas de estas metodologías incluyen: *Marcadores basados en la hibridación de sondas* como son el caso de RFLP (acrónimo del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism, “Polimorfismos en el Largo de los Fragmentos de Restricción, Bolstein et al., 1980) o VNTR (acrónimo del inglés: Variable Number of Tandem Repeats o “repeticiones en tándem de número variable”, Wyman y White, 1980). *Marcadores basados en secuenciación* tales como los SNPs (acrónimo del inglés: Single Nucleotide Polymorphisms, “Polimorfismo de Nucleótido Simple”, Gupta et al., 2001). *Marcadores basados en la amplificación por PCR* como son los RAPDs (acrónimo del inglés: Random Amplified Polymorphic DNAs o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente, Williams et al., 1990; Welsh y Mc Clelland, 1990) y AFLPs (acrónimo del inglés: Amplified Fragment Length Polymorphism o polimorfismos en la

longitud de fragmento amplificados, Vos et al., 1995). Dentro de esta última categoría se encuentran los MM microsatélites o SSR (acrónimo del inglés: Simple Sequence Repeats, “Repeticiones de Secuencia Simple”, Litt y Luty, 1989; de aquí en adelante MM-SSR), que fueron los MM utilizados en esta Tesis para el mapeo genético de los caracteres hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas y cuyas características principales se detallan a continuación.

Marcadores Moleculares Microsatélites (MM-SSR)

Los microsatélites son regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tándem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces. Se encuentran distribuidos por todo el genoma de la mayoría de las especies eucariotas y se detectan mediante su amplificación por PCR usando cebadores específicos de 20 a 30 pares de bases (pb) de longitud, que hibridan en la región que flanquea al tándem de repeticiones (microsatélite). Estos marcadores se resuelven por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, mediante tinción con plata o por autoradiografía (en el caso de usar un iniciador marcado radioactivamente). Si se dispone de un secuenciador automático, se pueden resolver por tamaño en este equipo mediante el empleo de un cebador marcado con un fluoróforo, posibilitando un análisis automatizado.

En el genoma de las plantas los microsatélites son muy frecuentes y se encuentran ampliamente distribuidos, con una frecuencia promedio de uno cada 10.000 pb, a lo largo de todo el genoma, siendo el elemento repetido más común el dinucleótido adenina-timina (AT). La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y consecuentemente, en el tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Estas diferencias son originadas durante la replicación del ADN debido a fallas en la acción de la ADN polimerasa durante el copiado de una región repetida donde incorpora o elimina repeticiones. Otro mecanismo responsable de la variación es el entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos. En este caso se generan alelos con diferencias en el número de repeticiones.

El desarrollo de marcadores microsatélites requiere del conocimiento de las secuencias flanqueantes a dichas repeticiones para el diseño de los cebadores específicos. Por el alto polimorfismo que suelen presentar por locus (multialelismo) se los considera los marcadores ideales para el mejoramiento de especies autógamas como la soja. Estos marcadores son codominantes (ambos alelos de un individuo heterocigota

pueden ser visualizados), genoma-específicos y altamente polimórficos en comparación con los RFLPs y RAPDs (Kalia et al., 2011).

Es importante destacar que en una especie como la soja, con bajo nivel de diversidad genética en el germoplasma cultivado disponible, los microsatélites han sido de gran utilidad para la construcción de mapas de ligamiento genético (Cregan et al., 1999). Sin embargo, una limitación de esta técnica es el gran trabajo previo de desarrollo de los microsatélites, es decir, la detección de las secuencias únicas flanqueantes a cada locus y la determinación posterior del polimorfismo. Ésta detección se ha facilitado en los últimos años a partir de la secuenciación de todo el genoma de la soja (Schmutz et al., 2010) que permitió, no solo identificar *in silico* secuencias repetidas (SSR) y a partir de ellas desarrollar marcadores moleculares locus-específicos (MM-SSR) sino que además permitió identificar genes, estudiar la evolución de la especie y la estructura del genoma.

Mejoramiento vegetal asistido por marcadores moleculares

Desde sus comienzos el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores. El grado de éxito en este proceso ha dependido y depende de: 1) el número de genes involucrados en el control genético del carácter (herencia monogénica o poligénica) y sus relaciones interalélicas (dominancia o aditividad) y 2) la influencia del ambiente, que se mide normalmente a través del parámetro de heredabilidad.

Durante muchos años los fitomejoradores fueron desarrollando nuevas variedades en los principales cultivos a través de la selección de fenotipos deseables con el objetivo de mejorar los rendimientos, la calidad nutricional y otros caracteres con valor comercial. Si bien estas técnicas de selección han sido y serán una herramienta valiosa para la producción de antiguas y futuras variedades, su utilización implica un costo elevado en tiempo y esfuerzo, ya que para la mayoría de los cultivos el desarrollo de un nuevo cultivar mejorado a menudo excede los 10 años (Moose y Mumm, 2008; Reyna y Sneller 2001; Tanksley et al., 1989). Por otro lado, si bien el mejoramiento convencional basado en la selección fenotípica ha sido históricamente efectivo; para algunos caracteres, este tipo de selección ha generado un progreso menor. Los efectos del ambiente, la interacción genotipo x ambiente y los errores en mediciones en muchos casos dificultan la evaluación de determinadas características y la identificación de los individuos que presentan los mayores valores de mejora.

Afortunadamente en los últimos tiempos la implementación de MM ha permitido aumentar la eficiencia de caracterización y/o selección de individuos con caracteres deseables (Collard and Mackill, 2008; Moose y Mumm, 2008). Eathington et al. (2007) indicó que el uso de MM en un programa de mejoramiento de maíz incrementó la eficiencia de mejora aproximadamente dos veces en relación a solo realizar selección fenotípica, además informó que ganancias similares fueron observadas para los cultivos de soja y de girasol.

La selección asistida por marcadores (SAM) es un método en el que el fenotipo es seleccionado por el genotipo del marcador (Collard et al., 2005). Es un proceso de selección indirecta basado en la existencia de co-segregación entre marcadores y un gen determinado. Su eficiencia depende de la distancia entre el marcador y el gen, y de la contribución de ese gen al fenotipo. Por lo general los MM utilizados en la SAM deben estar a menos de 5 centimorgan (cM) del gen o QTL (acrónimo del inglés: Quantitative Trait Locus, "locus de un carácter cuantitativo") de interés con el fin de asegurarse que solo una mínima proporción de los individuos seleccionados sean recombinantes (Jiang, 2013).

Así los MM permiten la introducción y seguimiento de genes de herencia cualitativa y de QTL de interés, así como también la agilización del proceso de recuperación de homocigosis en fondos genéticos particulares (Echenique et al., 2004).

La utilización de MM en un programa de mejoramiento puede representar una ventaja importante, y es que la selección se independiza del fenotipo y del ambiente. Esto determina una gran ventaja cuando se desean seleccionar caracteres que se expresan tardíamente en el desarrollo de los cultivos (como son características asociadas a flores y frutos), como así también, caracteres regidos por genes recesivos, cuya expresión se encuentra enmascarada en los individuos heterocigotas. Además, los MM permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un mismo fondo genético, proceso también denominado como "piramidización" o "apilamiento" de genes (Jiang, 2013). Sin embargo, a pesar de las ventajas citadas anteriormente, es importante destacar que los MM que no son correctamente testeados antes de su uso en la SAM, podrían no ser útiles para predecir el fenotipo, perdiendo funcionalidad. Es por ello, que antes de su implementación, es necesario crear mapas genéticos de alta resolución y validar en lo posible los MM en distintos fondos genéticos (Collard et al., 2005).

Selección asistida por marcadores moleculares para caracteres cualitativos

Algunas características como, resistencia a enfermedades, esterilidad masculina, caracteres relacionados con la forma, el color y la arquitectura de las plantas, etc, están contraladas por genes mayores o QTL mayores. Estos genes pueden ser seleccionados a través del uso de MM altamente ligados a los mismos con una mayor eficiencia en algunos casos, que la selección fenotípica directa de la característica (Jiang, 2013). Un ejemplo de la SAM para genes mayores podría ser el caso de la resistencia al nemátode del quiste de la soja (*Heterodera glycines*). En los programas de mejoramiento, el principal problema que presenta esta adversidad es la identificación de individuos resistentes, ya que la metodología de evaluación para este carácter es compleja. Este inconveniente se logró resolver a partir de la identificación del MM-SSR Satt309 ligado a 1-2 cM del gen de resistencia *rhg1*, que permitió predecir con una exactitud del 80-99% los individuos que eran resistentes, reduciendo los tiempos y el costo de la evaluación de esta característica.

Selección asistida por marcadores moleculares para caracteres cuantitativos

Por lo general, la mayoría de los caracteres agronómicos importantes están controlados por múltiples QTL. Este mayor número de genes involucrados, así como también las interacciones que se observan entre los distintos QTL con el ambiente, el fondo genético e inclusive con otros QTL (epistasias), han sido la causa de que a pesar de que en la última década se han conducido una gran cantidad de experimentos de mapeo de QTL, la aplicación y utilización de los MM ligados a los mismos en la SAM ha sido restringida (Collard and Mackill, 2008).

A pesar de esta complejidad relacionada con los caracteres cuantitativos, la SAM ha sido utilizada con éxito en los programas de mejoramiento para la incorporación de determinados caracteres de herencia poligénica de interés agronómico. Un claro ejemplo ha sido el Tizón de la espiga causado por *Fusarium graminearum* Schwabe, una de las enfermedades más destructivas de trigo y cebada. La resistencia a *Fusarium* es de herencia cuantitativa. Para esta enfermedad se han detectado numerosos QTL que confieren resistencia a la misma provenientes de diferentes fuentes de germoplasma. En el caso específico del trigo se encontró un QTL mayor que explicaba entre el 20-40 % de la variación fenotípica en la mayoría de los casos. Este QTL fue validado en diferentes

ambientes y poblaciones, lo que permitió su implementación en la SAM para obtener variedades resistentes a esta enfermedad (Anderson et al., 2007).

QTL. Concepto y análisis

QTL: Quantitative Trait Locus o “locus de un carácter cuantitativo”, se utiliza para describir una región del genoma o segmento cromosómico que tiene un efecto significativo sobre un rasgo o carácter cuantitativo (Tanksley, 1993). Los caracteres cuantitativos son atributos que están controlados por muchos genes que contribuyen con una pequeña proporción al fenotipo total (Collard et al., 2005). A diferencia de los caracteres cualitativos, están fuertemente influenciados por el ambiente, y presentan una distribución continua, métrica o normal. Dicha distribución está caracterizada por el valor medio y por la variancia (Jones et al., 1997). El tipo de herencia que presentan los caracteres cuantitativos es poligénica. En la herencia poligénica existen interacciones de genes que actúan aditivamente, lo que implica que el fenotipo está determinado por la suma (adición) de los efectos de los loci que intervienen en la expresión del carácter. Dichos genes son difíciles de identificar debido a la ausencia de una segregación genotípica observable y a que los efectos genotípicos de cada gen asociado con un carácter complejo son relativamente pequeños (Collard et al., 2005).

Los QTL pueden clasificarse en mayores o menores. Esta definición está basada en la proporción de la variación fenotípica que es explicada por el QTL (considerando el valor de R^2). Los QTL mayores, son aquellos que explican un 10% o más de la variación fenotípica para un carácter en una población segregante, en cambio, los QTL menores, explican menos del 10% de dicha variación. En algunos casos, los QTL mayores pueden referirse a aquellos que son estables a través de los ambientes, mientras que los QTL menores se refieren a aquellos que son sensibles al ambiente, especialmente los que están asociados con resistencias a enfermedades (Collard et al., 2005).

El análisis de QTL está basado en el principio de detección de asociación entre el fenotipo y el genotipo de los marcadores. Los marcadores se utilizan para dividir las poblaciones de mapeo en grupos genotípicos diferentes, basados en la presencia o ausencia de un marcador particular y así determinar si existen diferencias significativas entre los grupos con respecto al carácter que ha sido medido (Tanksley, 1993). Si se detectan diferencias significativas entre las medias de los grupos establecidos a través del genotipo

de un marcador en particular, indica que el locus del marcador utilizado para dividir la población de mapeo estaría ligado a uno de los QTL que controlan la característica.

Existen al menos tres métodos para la detección de QTLs:

Análisis de un solo marcador

En inglés, Single marker analysis o también llamado “Single point analysis”. Es el método más simple para detectar QTL asociados con marcadores simples. La población se divide en dos o más grupos según el tipo de población y el marcador empleado. Si se trata de una población F_2 y el marcador es codominante, se puede separar en 3 grupos. En cambio, si el marcador es dominante, se puede separar sólo en dos grupos. Si se trata de una población de RILs (acrónimo del inglés: Recombinant Inbred Lines, “líneas recombinantes endocriadas”) o haploides duplicados, sólo se puede separar en dos grupos independientemente de que el marcador sea dominante o codominante. Los métodos estadísticos que se utilizan para los análisis incluyen: prueba t de *Student* (Snedecor, 1964), análisis de la variancia (ANVA) y regresiones lineales (Collard et al., 2005; Tanksley, 1993; Liu, 1998). La regresión lineal es el método más utilizado ya que el coeficiente de determinación (R^2) del marcador representa el porcentaje de variación fenotípica que explica el QTL ligado a dicho marcador.

Al analizar un único marcador por vez, los efectos de los QTL están influenciados por la distancia entre el marcador y el QTL, por lo que puede ocurrir que dichos efectos sean subestimados por recombinación entre el marcador y el QTL. Para minimizar estos inconvenientes, debe usarse un alto número de marcadores segregantes distribuidos en todo el genoma, y separados por una distancia de 15 cM como máximo. Por lo tanto, si bien no es necesario contar con un mapa de ligamiento completo para detectar asociaciones, debe conocerse la ubicación del marcador en el genoma para estimar la confiabilidad de los resultados (Tanksley, 1993).

Análisis de mapeo por intervalos simples

En inglés “Simple interval mapping”. Éste método utiliza mapas de ligamiento y analiza simultáneamente intervalos entre pares adyacentes de marcadores ligados a lo largo de los cromosomas, en lugar de analizar los marcadores por separado (Collard et al., 2005).

El uso de marcadores ligados para el análisis compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL. Además éste método es considerado estadísticamente más potente comparado con el análisis de un solo marcador.

Análisis de mapeo por intervalos compuestos

En inglés “Composite interval mapping”. Este método combina el mapeo por intervalo, con regresiones lineales e incluye marcadores genéticos adicionales en el modelo estadístico, además de los marcadores ligados adyacentes considerados en el análisis anterior (Collard et al., 2005). Los marcadores adicionales son utilizados como cofactores para controlar la variación genética debido a la segregación del QTL en otras partes del genoma. Éste método es mucho más preciso y efectivo para el mapeo de QTL, especialmente cuando se detectan QTL ligados.

Los modelos de análisis por intervalos permiten estimar con suficiente precisión la posición y el efecto de los QTL. Para realizar los análisis se han desarrollado softwares específicos como Qgene (Joehanes R y Nelson JC, 2008) o QTL Cartographer (Wang et al., 2011). Los resultados se presentan en forma de perfiles de probabilidades de localización del QTL (LOD score) a lo largo de cada cromosoma. Para estos análisis el LOD score representa el logaritmo de la probabilidad de que el valor observado se deba a la presencia de un QTL / la probabilidad de obtener el mismo valor por azar. En general, LOD scores mayores a 2 indican la presencia de un QTL, dependiendo del tipo y tamaño de la población bajo estudio.

QTL. Estrategias para su detección rápida

La construcción de mapas de ligamiento y los análisis de QTLs requieren de tiempo, esfuerzo y dinero. Los costos asociados con el fenotipado y genotipado a gran escala son el cuello de botella para poder identificar QTLs con efectos consistentes en diferentes ambientes y en distintos fondos genéticos. Es por ello que se han desarrollado métodos alternativos para reducir los costos para identificar marcadores ligados a QTLs de interés. Estos métodos incluyen BSA (acrónimo del inglés: Bulk Segregant Analysis, “análisis de segregantes en grupo”) y el genotipado selectivo o ‘Selective Genotyping’ (Collard et al., 2005). Estas metodologías se han aplicado en los últimos años en el estudio de diversos

caracteres de interés agronómico de los principales cultivos extensivos (Bales et al., 2013; Quarrie et al., 1999; Venuprasad et al., 2009; Vikram et al., 2012; Zhang et al., 2009).

El BSA es una metodología que fue inicialmente descrita por Michelmore et al. (1991), y consiste en detectar polimorfismos entre dos grupos de muestras de ADN tomadas de una población segregante. Cada muestra está constituida por la mezcla de cantidades iguales de ADN genómico de individuos seleccionados de los extremos de la distribución de frecuencias de una población (Figura 12). Estos grupos deberían diferir para el carácter de interés. Con la creación de grupos de individuos se logra aleatorizar todos los loci excepto la región que contiene el gen de interés. Luego los marcadores son evaluados en los dos grupos, y aquellos que resultan polimórficos, representarían los marcadores que estarían ligados al gen o QTL de interés. A continuación toda la población es genotipada con los marcadores que resultaron polimórficos, pudiéndose generar luego un mapa de ligamiento. Si bien el método de análisis de segregantes en grupos fue primeramente utilizado para la identificación de marcadores ligados a genes que conferían resistencia a enfermedades, en los últimos años se lo ha comenzado a utilizar para identificar QTLs asociados con resistencia a sequía en arroz, maíz y trigo, así como también a diversos caracteres asociados a rendimiento (Spencer et al., 2003; Vikram et al., 2012).

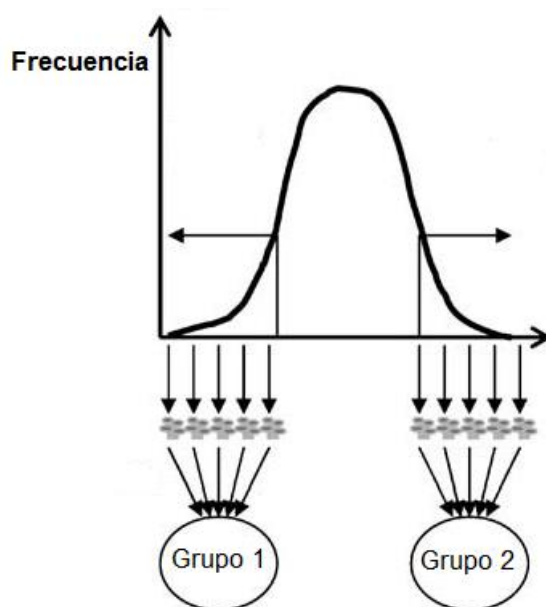


Figura 12. Figura adaptada del trabajo de Collard et al. (2005). Representación del método de análisis de segregantes en grupo (BSA, Bulk Segregant Analysis) utilizado para la detección de marcadores ligados a caracteres cualitativos o QTLs mayores. Los Grupos 1 y 2 están conformados por individuos extremos de la distribución de frecuencias para un carácter en particular.

El genotipado selectivo consiste en seleccionar individuos extremos de la distribución de frecuencias de una población. El mapa de ligamiento y el análisis de QTL se realizan únicamente con los individuos que presentan fenotipos extremos. Al realizar el genotipado de una submuestra de la población se reducen los costos del mapeo. La principal desventaja que presenta éste método es que no es eficiente para determinar los efectos de los QTL y al igual que el BSA, permite testear un solo carácter a la vez.

Estas dos metodologías presentadas anteriormente son muy útiles para identificar QTL mayores, los cuales son los más importantes para la SAM, pero podrían fallar en la identificación de QTL con efectos menores, ya que solo líneas extremas son utilizadas para el análisis. Además, con éstas aproximaciones, es menos probable que se detecten interacciones epistáticas entre diferentes loci (Vikram et al., 2012).

CAPÍTULO II: SECCIÓN 1

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL CARÁCTER FORMA DE HOJA

II.1.1. INTRODUCCIÓN

Como se citó en la Introducción del Capítulo I, la forma de los folíolos de soja cultivada (*G. max*) puede clasificarse en dos categorías: oblonga (también denominada “hoja ancha”) y lanceolada (también denominada “hoja angosta”). La mayoría de los cultivares de soja presentan hojas con folíolos oblongos (Dinkins et al., 2002). Sin embargo, se ha observado que cultivares de origen asiático, así como también materiales silvestres (*G. Soja*), presentan por lo general, hojas con folíolos lanceolados (Porter, 2000).

La regulación del carácter forma de hoja en *G. max*, se la ha atribuido a un único gen mayor, con lo cual es considerado un carácter cualitativo y por lo tanto, no influenciado por el ambiente (Sujata et al., 2011). Uno de los primeros trabajos en los que se estudió la herencia de este carácter fue el de Domingo (1945). Domingo encontró que plantas con folíolos lanceolados producían únicamente plantas con dicha forma de hoja. Además observó, que la segregación de las plantas en poblaciones F_2 ajustaba a una segregación 3:1 (3: oblonga 1: lanceolada), que es la segregación esperada cuando un solo gen con dominancia completa controla la característica. En un principio el carácter se designó con la sigla *Na*. Las plantas que tenían una constitución genética recesiva (*nana*) tenían folíolos lanceolados, y las plantas de constitución genética dominante y heterocigota (*Na*_) presentaban folíolos oblongos.

Bernard y Weiss (1973) posteriormente, plantearon la utilización de una nueva simbología para designar el carácter forma de hoja, ello se debió a que un grupo de *loci* que controlan caracteres relacionados generalmente tienen la misma letra inicial. En este caso, la forma de los folíolos incluye el gen *Lf* que es responsable del número de folíolos por hoja. Por lo tanto, los autores designaron al gen que determina la forma de los folíolos con el símbolo *Ln*. Los genotipos homocigotas dominantes se designaron *Ln/Ln* (oblongos), los heterocigotas *Ln/l_n* (oblongos) y los homocigotas recesivos *l_n/l_n* (lanceolados).

Sawada (1988), definió un método de clasificación de la morfología foliar a través del desarrollo de un índice de forma de hoja (IFH). Para ello, utilizó las medidas de largo y ancho del folíolo central de cada hoja, para categorizar a las plantas en diferentes grupos.

Con

las

medidas de largo y de ancho estableció una relación a través del cociente entre ambas mediciones. Plantas que presentaban folíolos con una relación menor de 2,6 eran consideradas oblongas, mientras que con una relación mayor o igual a 2,6 eran consideradas lanceoladas. Recientemente, Krisnawati y Adie (2017) utilizando el mismo índice que Sawada, establecieron un límite para diferenciar los genotipos lanceolados de los oblongos de 2,4.

Plantas con folíolos lanceolados generalmente presentan hojas con una relación de largo dos veces mayor que el ancho, mientras que plantas con folíolos oblongos suelen tener una relación largo/ancho de 1,5 (Porter, 2000).

Porter (2000), analizó la herencia del carácter forma de hoja en cruzamientos en los que empleó como parentales genotipos de soja tanto cultivada como silvestre (*G. max* y *G. soja*). En dicho trabajo, los parentales utilizados de *G. max* para la obtención de las poblaciones segregantes presentaban un rango de variación de la relación largo/ancho de 2,5 a 3,1 para genotipos con folíolos lanceolados y de 1,2 a 1,6 para genotipos con folíolos oblongos. Cuando se realizaron los análisis de progenie, para poder diferenciar entre los materiales lanceolados y oblongos, definió un valor de relación largo/ancho de: $< 1,5$, para genotipos oblongos y $> 2,0$, para genotipos lanceolados. Los parentales utilizados de *G. soja* presentaban una forma de hoja mucho más angosta que las líneas lanceoladas de la soja cultivada, presentando un rango de variación largo/ancho de 4,2 a 5,6. En el caso de los cruzamientos con soja silvestre, el autor definió seis categorías para caracterizar la morfología foliar, dado que la variabilidad en la forma de hoja en esos cruzamientos era mucho mayor. Cuando analizó los resultados de cruzamientos derivados de genotipos con folíolos lanceolados y oblongos de soja cultivada, arribó a las mismas conclusiones que Domingo (1945), Bernard y Weiss (1973) y Sawada (1988) quienes establecieron que la forma de hoja lanceolada es controlada por un gen simple recesivo. Por el contrario, cuando evaluó la segregación de cruzamientos entre líneas de *G. max* y de *G. soja* observó que habría al menos uno o dos genes recesivos que estarían controlando la forma de hoja lanceolada en las accesiones de *G. soja*, que no serían alelos del gen *ln*, presente en las sojas cultivadas.

Dinkins et al. (2002), establecieron que los genotipos heterocigotas presentan una relación largo/ancho intermedia entre los dos homocigotas. En su trabajo los autores determinaron que el IFH les permitía distinguir entre las tres clases fenotípicas (homocigotas dominantes, homocigotas recesivos y heterocigotas).

Si bien el gen que regula la morfología foliar en sojas cultivadas (*G. max*) fue uno de los primeros en ser analizados en los estudios de genética clásica (Domingo, 1945), su

localización en el Grupo de Ligamiento Molecular (GLM) I (Cromosoma 20) de la soja fue realizado recién por Cregan et al. (1999) en la década del 90. Los autores ubicaron al gen en una región de 27,3 cM delimitada por los MM-SSR: Satt587 y Satt049. Posteriormente, Song et al. (2004), diseñaron nuevos MM-SSR que permitieron delimitar al gen en una región más estrecha de 5,0 cM entre los marcadores Satt270 y Sat_268.

Finalmente, en un trabajo más reciente Jeong et al. (2011) diseñaron nuevos cebadores en la zona delimitada por Song et al. (2004) con el objetivo de encontrar MM-SSR altamente ligados al gen *Ln*. Como resultado se identificaron nueve MM-SSR nuevos. De esta manera el gen quedó delimitado en una región de 0,7 cM o 66 kb entre los marcadores Ln_at004 y Ln_atre04. En esa región los autores encontraron tres genes: *Glyma20g24980.1*, *Glyma20g.24490.1* y *Glyma20g25000.1*, de los cuales *Glyma20g25000.1* fue postulado como gen candidato de la regulación del carácter forma de hoja. En un trabajo posterior Jeong et al. (2012), a través del uso de SNPs delimitaron una región mas estrecha de 12,6 Kb encontrando el mismo gen que habían postulado previamente (*Glyma20g25000.1*, posicionado físicamente entre 34.688.514 y 34.690.379 pb en el GLM I, Cromosoma 20) y que fue designado como *Gm-JAGGED1*. Este gen sería homólogo de un factor de transcripción presente en *Arabidopsis thaliana*: *JAGGED* (*JAG*) cuya función estaría asociada con el crecimiento de órganos laterales aéreos incluyendo hojas y flores (Dinnery et al., 2004; Ohno et al., 2004). Los autores detectaron en la región que codifica dicho gen una mutación en un nucleótido simple que provocaba un cambio en un aminoácido simple (ácido aspártico (*Gm-JAG1*) por histidina (*Gm-jag1*)). Esta mutación sería la responsable entonces de las variaciones observadas en la morfología foliar.

Teniendo en cuenta las ventajas potenciales que genera la incorporación del carácter forma de hoja lanceolada mencionados en la literatura (Egli et al., 1970; Hicks et al., 1969; Suh-Sugkee et al., 2000; Sung y Chen 1989; Wells et al., 1993), así como los informados en esta Tesis (Capítulo I), y considerando además que las variedades presentes en el mercado Argentino son en su gran mayoría de hojas oblongas, resulta interesante poder incorporar el carácter hoja lanceolada en los esquemas de mejoramiento actuales. Para ello, un aspecto importante a tomar en consideración, es la regulación genética que presenta el carácter. Como se menciona arriba, la forma de hoja lanceolada en *G. max* está regida por un gen recesivo simple (Bernard y Weiss, 1973; Domingo, 1945; Sawada, 1988). El inconveniente que presentan los genes recesivos es que los mismos quedan enmascarados por los alelos dominantes cuando se efectúan los cruzamientos (en este caso tanto los individuos F1, como todos los individuos heterocigotas de las siguientes generaciones siempre tendrán el fenotipo folíolos oblongos). Esto determina que en un esquema de retrocruza para

incorporar el gen lanceolado sea necesario, en cada retrocruza, avanzar hasta la generación siguiente para detectar los genotipos lanceolados y continuar con el proceso, prolongando así los tiempos de obtención de nuevas variedades.

Considerando lo mencionado previamente resultó de interés identificar MM-SSR ligados al carácter hoja lanceolada en fondos genéticos agrónomicamente competitivos, con el fin de utilizarlos en un esquema de SAM orientado a la introgresión rápida de dicho carácter en germoplasma elite de soja. En este contexto es pertinente mencionar que MM estrechamente ligados a un carácter en un fondo genético particular, no siempre resultan de utilidad cuando se los quiere emplear en otros fondos genéticos (Collard et al., 2005). Es por ello que en una primera etapa, se validaron los MM-SSR que habían sido previamente citados como ligados al gen *Ln* en el fondo genético utilizado en este estudio. En una segunda etapa, con el fin de incrementar la densidad de marcadores en la región en la que se ubica el gen que regula la forma de hoja, se analizaron nuevos MM-SSR, obtenidos de las bases de datos de Hisano et al. (2007), Song et al. (2010; 2016) y de SoyBase (<http://soybase.org>).

Por último, a partir de la construcción del mapa de ligamiento genético, se buscó establecer si el gen que determinaba la forma de hoja lanceolada en los materiales utilizados en esta Tesis, correspondía a un alelo del gen *ln*, molecularmente localizado en el GLM I (Cromosoma 20) de la soja (Cregan et al., 1999; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004).

II.1.2. OBJETIVOS

Objetivo Molecular Específico

1. Identificar marcadores moleculares microsatélites ligados al carácter hoja lanceolada en un fondo genético de buen comportamiento agronómico para aumentar la eficiencia de selección de los genotipos heterocigotas en un esquema de retrocruzas orientado a la introgresión rápida del carácter en germoplasma elite de soja.

II.1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Genotipos parentales y poblaciones segregantes

En la primer parte de esta sección se va a detallar como se obtuvieron las poblaciones utilizadas tanto para la identificación de los MM-SSR ligados al carácter forma de hoja como así también al alto porcentaje de vainas de cuatro semillas. Es importante aclarar que la búsqueda de los MM-SSR ligados a los QTL asociados al alto porcentaje de vainas de cuatro semillas se realizó a través de la caracterización de la variable NPSV. Esto se debe, a que como se explicó en el Capítulo I, en la Introducción, el NPSV es un índice que se obtiene a través de un promedio ponderado que considera las distintas clases de vainas que están presentes en una planta. Por lo tanto, teniendo en cuenta que rara vez en una planta se encuentra una sola clase de vainas, este índice es un mejor estimador de la importancia relativa que tiene cada categoría. De esta manera, a través del análisis del NPSV, fue posible determinar el porcentaje de vainas de cuatro semillas que presentaba cada una de las plantas evaluadas. A modo de ejemplo, plantas con 60 % vainas de cuatro semillas y 40 % de vainas de tres semillas tuvieron un NPSV = 3,6.

Para el mapeo genético y la caracterización fenotípica de los dos caracteres se obtuvieron poblaciones segregantes F_2 y tres poblaciones de RILs. Dichas poblaciones fueron obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis doctoral. Para la obtención de las mismas se utilizaron parentales de buen comportamiento agronómico que diferían en la forma de los folíolos y en el NPSV ($P < 0,001$), entre otros caracteres. Los genotipos utilizados fueron: FV-L4D, FV-L4F y FV-L4G, portadores de los caracteres hoja lanceolada y alto NPSV, mientras que los genotipos FV-O2A y FV-O2B presentaban hoja oblonga y bajo NPSV (Figura 13). Los genotipos utilizados como parentales fueron seleccionados de la población de 43 pares de isolíneas obtenida para la realización de los ensayos ecofisiológicos, citada en el Capítulo I, en la sección de Materiales y Métodos. Las características principales de dichos genotipos se detallan en la Tabla 8.

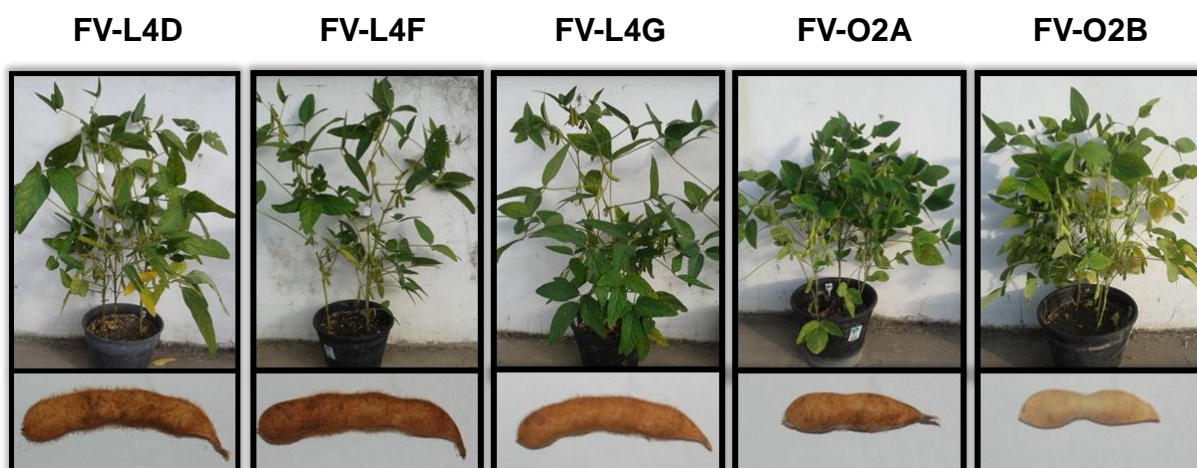


Figura 13. Imágenes de las líneas parentales utilizadas para la obtención de las poblaciones segregantes F_2 y las RILs (Recombinant Inbred Lines; "líneas recombinantes endocriadas"). Foto superior plantas en el estadio R5, foto inferior vainas en el estadio de madurez: R8 (según escala de Fehr y Caviness, 1977). De izquierda a derecha se muestran los genotipos FV-L4D, FV-L4F, FV-L4G, FV-O2A y FV-O2B.

Tabla 8. Características principales de las líneas parentales utilizadas para la obtención de las poblaciones segregantes F_2 y RILs.

Líneas	Forma de hoja	Color de flor	Pubescencia	NPSV ⁽¹⁾	PUS ⁽²⁾ (mg)
FV-L4D	Lanceolada	Púrpura	Leonada	3,6 ± 0,02	156,1 ± 2,06
FV-L4F	Lanceolada	Blanca	Leonada	3,5 ± 0,03	142,5 ± 2,00
FV-L4G	Lanceolada	Púrpura	Leonada	3,6 ± 0,02	142,2 ± 1,15
FV-O2A	Oblonga	Blanca	Gris	2,2 ± 0,01	161,5 ± 1,53
FV-O2B	Oblonga	Blanca	Gris	2,3 ± 0,03	162,3 ± 2,83

⁽¹⁾ NPSV: Número promedio de semillas por vaina. Las líneas lanceoladas diferían significativamente en el NPSV comparadas con las líneas oblongas ($P < 0,0001$), según test-t.

⁽²⁾ PUS: Peso Unitario de las Semillas. La línea FV-L4D difería significativamente en el PUS comparada con las dos líneas oblongas ($P < 0,10$), según test-t. A su vez, las líneas FV-L4F y FV-L4G diferían significativamente en el PUS en relación con las dos líneas oblongas ($P < 0,01$), según test-t.

Para los caracteres NPSV y PUS se muestran los valores promedios con su respectivo error estándar.

Los cruzamientos se llevaron a cabo en los invernáculos de la Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Para ello las semillas de los parentales fueron sembradas en macetas de 4 litros, conteniendo como sustrato una mezcla de tierra: perlita de lava volcánica en una proporción 3:1 y fueron regadas con agua por subirrigación. Se realizaron tres fechas siembra comenzando el 23/08/2012 con el objetivo de que coincidiera

la floración de los parentales. Durante toda la estación de crecimiento de las plantas se controlaron los insectos, enfermedades y malezas.

A partir del mes de Octubre de 2012 se iniciaron los cruzamientos entre los parentales. Para la realización de los mismos se tuvieron en cuenta aquellos caracteres morfológicos en los que diferían dichos parentales con el fin de poder determinar posteriormente la efectividad de los cruzamientos. Los caracteres que se consideraron fueron: forma de hoja, color de flor y pubescencia. Es importante destacar, que el carácter color de flor púrpura, forma de hoja oblonga y pubescencia leonada, son caracteres cualitativos que presentan una acción génica de dominancia completa. La cosecha de los cruzamientos se realizó a partir del mes de Diciembre de ese mismo año. A continuación las semillas F_1 se sembraron a campo y fenotípicamente se descartaron aquellas plantas que provenían de autofecundaciones.

Con el objetivo de obtener plantas de gran porte, para producir el mayor número de semillas posibles, se colocaron luces LED durante la etapa vegetativa que irradiaban longitudes de onda en el rango del rojo (650-670 nm) entre las 00:00 h y las 02:00 h a.m., que generaron la interrupción del escotoperíodo. De esta manera se logró prolongar la etapa vegetativa postergando el inicio de la floración.

La cosecha de las plantas F_1 se realizó entre el 22/05/2013 y el 27/06/2013. Se obtuvieron 34 poblaciones F_2 , con un número de semillas totales que varió entre 819 y 2500 para cada población. De las 34 poblaciones obtenidas se seleccionaron las cinco más numerosas: J3, J14, J81, N3 y N9, provenientes de los cruzamientos entre los genotipos (FV-L4F x FV-O2B), (FV-L4D x FV-O2B), (FV-O2B x FV-L4G), (FV-O2A x FV-L4D) y (FV-O2A x FV-L4G), respectivamente (de cada cruzamiento, el primer parental corresponde a la línea que se utilizó como madre y el segundo, a la línea que se utilizó como padre). La población F_2 J14 en un principio se la utilizó para la identificación de los MM-SSR ligados al gen que regula la forma de hoja. La elección de esta población se basó en que el parental lanceolado además de presentar alto NPSV, presentaba buen peso unitario de semillas, comparado con los otros dos parentales lanceolados (Tabla 8). Esta población junto con las poblaciones N3 y N9 se utilizaron para la obtención de las RILs a través de método de descendencia de semilla única (Brim, 1966). Para ello, a partir de la generación F_2 se realizaron cinco ciclos de autofecundación. Dos se condujeron a campo y los otros tres en contra estación en condiciones de invernáculo. Ello permitió, que en tres años se alcanzara una generación F_6 . Además, durante las estaciones de crecimiento 2013/14 y 2014/15, se realizaron nuevos cruzamientos con el fin de incorporar individuos F_1 en los ensayos comparativos de las RILs. Las otras dos poblaciones (J3 y J81), se utilizaron para la

caracterización fenotípica en F₂ del carácter NPSV. El esquema de obtención de las cinco poblaciones se muestra en la Figura 14.

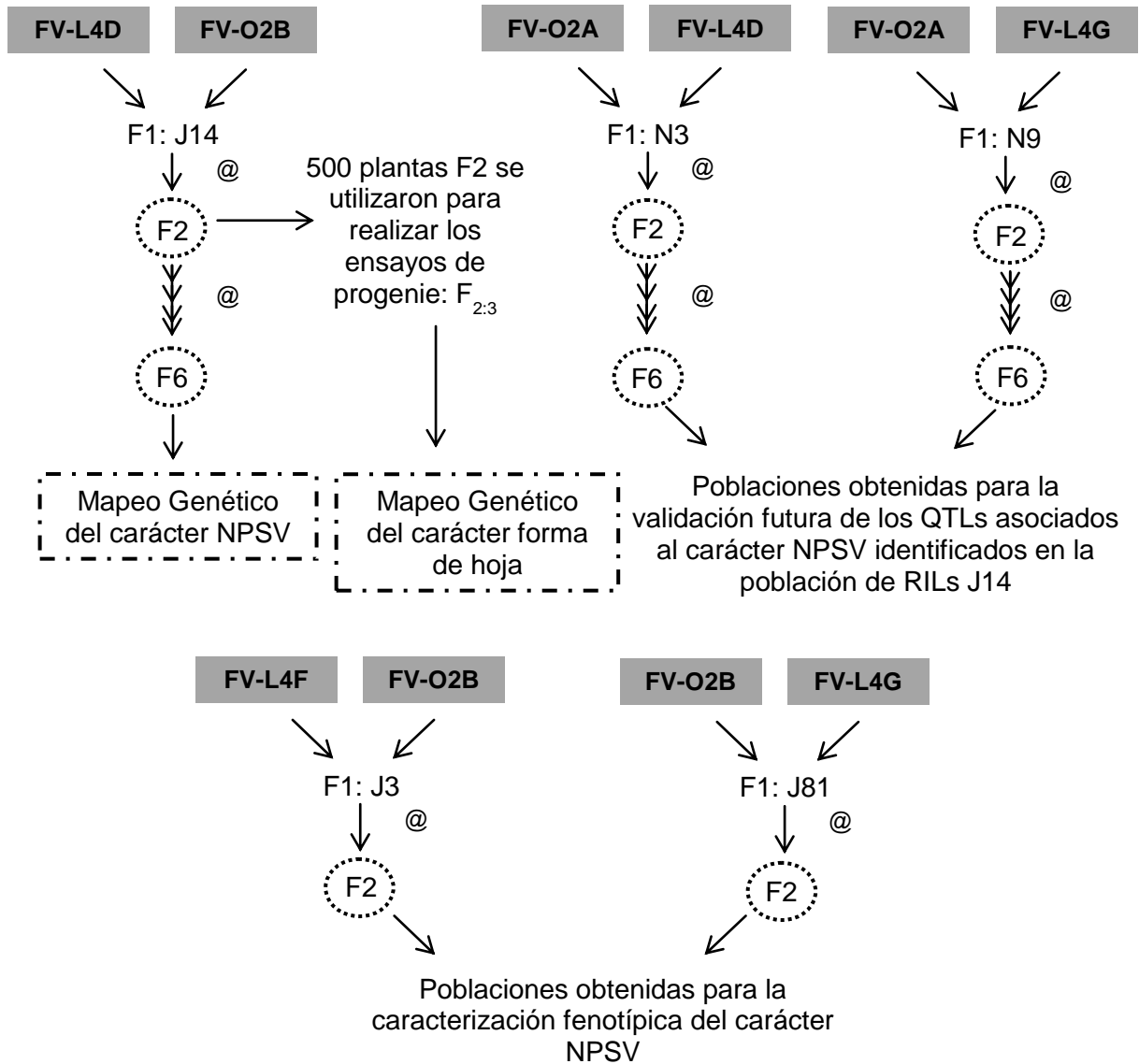


Figura 14. Esquema de obtención de las poblaciones utilizadas para la caracterización fenotípica del carácter forma de hoja y del número promedio de semillas por vaina (NPSV).

A partir de este momento se detallará la metodología aplicada para la identificación de los MM-SSR ligados solo al carácter forma de hoja. En la Sección 2 se detallará la metodología aplicada para la identificación de los QTLs asociados al NPSV.

Para el mapeo genético del carácter forma de hoja, como se disponía de una gran cantidad de semillas de la población F₂ J14 (2000) se seleccionaron 500 semillas al azar

para luego realizar los ensayos de progenie. Las mismas se sembraron el 19/07/2013 en un invernáculo de polietileno en surcos distanciados a 0,52 m y a una distancia entre plantas de 0,10 m. Durante toda la estación de crecimiento de las plantas se controlaron los insectos, enfermedades y malezas.

Caracterización fenotípica de los parentales y de la población segregante F_2 J14

Con el objetivo de mejorar la caracterización fenotípica de los materiales, además de realizar una clasificación visual de la forma de los folíolos, se calculó el IFH en el estadio R2 (plena floración, según escala de Fehr y Caviness, 1977) para cada individuo de la población segregante F_2 , los parentales y los individuos F_1 utilizando la metodología propuesta por Sawada (1988) y Chen y Nelson (2004). Para ello, se seleccionó el folíolo central de hojas totalmente expandidas, situadas en el tercer o cuarto nudo del tallo principal contando desde el ápice hacia abajo. Para cada folíolo seleccionado se midió el largo y el ancho. La relación largo/ancho se obtuvo a través del cociente entre el sector más largo del folíolo y del sector más ancho. Para determinar si existían diferencias significativas para el IFH entre los individuos analizados, se realizó una prueba *t* de Student (Snedecor, 1964).

Ensayo de progenie

El tipo de población segregante que confiere mayor información es una F_2 completamente caracterizada (Allard, 1956). Los individuos F_2 identificados como oblongos, podían ser tanto homocigotas como heterocigotas, por lo tanto, para inferir el genotipo de cada uno de los individuos F_2 se procedió al estudio de su respectiva progenie ($F_{2:3}$). Para ello, el 13/12/2013 se sembraron a campo 500 familias $F_{2:3}$ en surcos de 16 semillas cada uno. La distancia entre semillas fue de 0,10 m y entre surcos fue de 0,52 m. En el estadio R2 cada familia $F_{2:3}$ se clasificó como oblonga: cuando todos los individuos presentaban forma de hoja oblonga; heterocigota: cuando se observaban individuos con forma de hoja oblonga y lanceolada dentro del surco y lanceolada: cuando todos los individuos presentaban forma de hoja lanceolada.

Análisis de segregación

Para verificar que la segregación fenotípica y genotípica observada se ajustara a la esperada para un carácter de herencia monogénica con dominancia completa, se realizaron las pruebas estadísticas Chi-cuadrado (χ^2) correspondientes a cada generación utilizada (Tabla 9). Es importante tener en cuenta, que cuando se realizan ensayos de progenie ($F_{2:3}$) se analiza el fenotipo de la generación F_3 , pero se infiere el genotipo de la generación F_2 (Lacadena, 1988).

Los análisis de Chi-cuadrado (χ^2) se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS University Edition (2017).

Tabla 9. Segregación fenotípica y genotípica esperada para un locus con dominancia completa en las distintas generaciones filiales (Lacadena, 1988).

Generación	Segregación Fenotípica	Segregación Genotípica
F_1	Todos los individuos oblongos	Todos los individuos heterocigotas ($Lnl n$)
F_2	3 oblongos: 1 lanceolado	1 homocigota dominante ($LnLn$): 2 heterocigotas ($Lnl n$): 1 homocigota recesivo ($lnln$)
$F_{2:3}^1$	1 oblongo: 2 heterocigotas 1 lanceolado	

¹ Ensayo de progenie ($F_{2:3}$)

Caracterización molecular

Extracción del ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de hojas jóvenes totalmente expandidas que se encontraban en el estadio V2-V3 (según escala de Fehr y Caviness, 1977), obtenidas de las plantas F_2 sembradas en el invernáculo en Julio de 2013 (citada anteriormente en los Materiales y Métodos). Cada muestra de hoja se tomó por duplicado. Se seleccionaron hojas jóvenes del estrato superior de las plantas, a fin de obtener ADN de mejor calidad. Las muestras fueron introducidas una vez separadas de la planta madre en nitrógeno líquido, para producir un congelamiento rápido y de esta forma frenar todos los procesos metabólicos que pudieran ocasionar la degradación del material genético. Luego las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de la purificación del ADN.

De las 500 plantas F₂ se seleccionaron al azar 130 individuos para realizar el análisis molecular. La selección de esta cantidad de individuos, surgió de tener en cuenta el número de genotipos que se pueden evaluar en los geles de electroforesis de poliacrilamida, teniendo en cuenta los peines de la cuba electroforética disponible en el laboratorio y realizando una doble siembra de los productos de PCR.

Como primer paso en la extracción del ADN genómico las muestras fueron molidas en un mortero en presencia de N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. La extracción del ADN se realizó de acuerdo al método descrito por Shagai-Marroof (Shagai-Marroof et al., 1984) (mini CTAB) con las siguientes modificaciones: se agregó 1 mL de amortiguador de extracción compuesto por: [2 % CTAB (bromuro dehexadeciltrimetilamonio), 0,02 M EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,1 M Tris-HCl (Tris: Hidroximetil Aminometano, pH 8,0), 1,4 M NaCl, 0,4 % β-Mercaptoetanol y una punta de espátula de polivinilpirrolidona (PVP)], por cada gramo de tejido, aproximadamente.

La mezcla así obtenida por inversión y agitación muy suave, se incubó a 65°C por 30 min, seguido por 15 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se colocaron 500 µL de cloroformo frío (-20 °C) con el fin de desnaturalizar las proteínas. Este procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente la fase superior acuosa fue removida cuidadosamente e incubada en 1 mL de etanol 95 % a -20 °C por 1 h, lográndose así, la precipitación del ADN. A continuación, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min, se retiró el etanol, y se lavó nuevamente con etanol 80 %. Luego la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min, se retiró el alcohol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se evaporara todo el etanol. Finalmente, el ADN se suspendió en 200 µl de agua tri-destilada y se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

La cuantificación del ADN extraído de cada muestra se realizó por medición espectrofotométrica de la absorbancia (Abs) a 260 nm y la pureza del mismo se evaluó mediante el índice de Abs 260 nm/Abs 280 nm. Para ello se utilizó el espectrofotómetro UV-visible LAMBDA Bio+ PerkinElmer. En general se obtuvo un rendimiento de 50 a 400 µg de ADN por muestra.

La integridad del ADN genómico se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 % utilizando amortiguador TAE 1 X (40 mM de Tris, 5 mM de Acetato de Sodio y 0,77 mM de EDTA) en un sistema submarino con una corriente de 80 mA. Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ mL) y se utilizó luz ultravioleta para visualizar la presencia de una banda de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico (Sambrook et al., 1989).

Una vez cuantificadas todas las muestras de ADN genómico, las mismas fueron llevadas a una concentración final de 300 ng/ μ l y almacenadas a -20°C para su posterior utilización. Al momento de su uso, para evitar la degradación de las mismas se prepararon soluciones de trabajo que consistieron en diluciones a partir de la muestra original hasta una concentración final de 20 ng/ μ L.

Amplificación de Repeticiones de Secuencias Simples (Microsatélites)

Dado que en la actualidad se conoce la localización molecular del gen *Ln*, que es el que regula la característica forma de hoja en sojas cultivadas ubicado en el GLM I (cromosoma 20), inicialmente se probaron todos aquellos MM-SSR que habían sido publicados en trabajos previos como ligados a dicho gen (Cregan et al., 1999; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004). Además, para mejorar la resolución del mapa en dicha región se seleccionaron nuevos MM-SSR obtenidos a partir de las bases de datos de BARCSOYSSR 1.0 (Song et al., 2010; 2016) y de Soybase (<http://soybase.org>). Adicionalmente, se seleccionaron cebadores SSR provenientes de mapas de soja generados a partir de ESTs (acrónimo del inglés “expressed sequence tag” o marcador de secuencia expresada, Hisano et al., 2007). Los nuevos marcadores analizados cubrieron una región aproximada de 5 cM o 0,95 Mb (desde 34.223.176 pb hasta 35.176.139 pb) del GLM I, que es la región donde se localiza el gen *Ln*.

Las secuencias de los cebadores se obtuvieron de las bases de datos citadas anteriormente y fueron sintetizados por el laboratorio Invitrogen, Buenos Aires, Argentina (<http://www.thermofisher.com>).

En total se analizaron 46 pares de cebadores. De los cuales 25, correspondieron a nuevos MM-SSR no analizados previamente (Tabla 10).

La evaluación de los MM-SSR se realizó como se detalla en Cregan y Quigley (1997) con pequeñas modificaciones. Los experimentos de PCR fueron realizados en 20 μ l de volumen final de reacción conteniendo: 20 ng de ADN genómico, 1 X de amortiguador Taq, 2 mM de MgCl_2 , 100 μ M de cada dNTP, 1 U de enzima Taq ADN polimerasa, 3 μ M de cada cebador oligonucleótido y agua tri-destilada estéril hasta completar el volumen. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un controlador térmico programable TC-PRO (BOECO). Los ciclos comenzaron con 2 min a 95°C , seguidos de 33 ciclos de: 25 segundos de desnaturalización a 92°C , 25 segundos de hibridación a $47-60^{\circ}\text{C}$ (considerando la temperatura óptima probada para cada par de cebadores) y 25 segundos

de extensión a 68 °C. Al finalizar los ciclos se incluyó una incubación final de 3 min a 72 °C. Los productos de la amplificación se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 10. Marcadores moleculares microsatélites seleccionados para detectar polimorfismos entre los parentales FV-L4D (línea lanceolada) y FV-O2B (línea oblonga) de la población J14, localizados en el grupo de ligamiento molecular I.

GLM ⁽¹⁾	Marcadores Moleculares Microsatélites (MM-SSR) ⁽²⁾
I	Satt562, Satt239, Satt270, Sat_268, Sat_104, Sat_418, Satt292, Satt623, AQ851518, Satt148, Ln_at001, Ln_at003, Ln_at004, Ln_attre, Ln_atre04, Ln_atre06, Ln_at006, Ln_at008, Ln_at013, Sat_105, BARCSOYSSR_20_0806 , BARCSOYSSR_20_0809 , BARCSOYSSR_20_0817 , BARCSOYSSR_20_0829 , BARCSOYSSR_20_0831 , BARCSOYSSR_20_0842 , BARCSOYSSR_20_0850 , BARCSOYSSR_20_0853 , BARCSOYSSR_20_0819 , GMES1146 , BARCSOYSSR_20_0845 , BARCSOYSSR_20_0847 , BARCSOYSSR_20_0782 , BARCSOYSSR_20_0895 , BARCSOYSSR_20_0832 , BARCSOYSSR_20_0840 , BARCSOYSSR_20_0798 , BARCSOYSSR_20_0860 , GMES5938 , GMES2409 , GMES5828 , GMES0205 , GMES2648 , GMES2001 , GMES5714 , Satt354

(1) GLM: Grupo de Ligamiento Molecular.

(2) SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple".

(3) En negrita se resaltan los nuevos MM-SSR seleccionados para saturar la región donde se localizaría el gen *Ln*, que determina la forma de hoja, obtenidos de las bases de datos de Hisano et al. (2007), Song et al. (2010; 2016) y Soybase.

Separación de los productos de amplificación y visualización por tinción con nitrato de plata

Los productos de amplificación fueron separados y analizados en geles de poliacrilamida. Se utilizó una cuba para electroforesis de geles de secuencia Modelo S2 (Life Technologies). El armado del gel se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Life Technologies), con vidrios de 0,40 m de largo por 0,33 m de ancho y 4 mm de espesor. Se emplearon espaciadores de 0,8 mm y peines de diente de tiburón de 68 dientes. La matriz del gel se preparó usando una solución de 6 % de acrilamida, 0,3 % de metilen-bisacrilamida, 5,6 M de urea y 25 % de formamida en presencia de 0,5 X de amortiguador TBE [50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA (pH 8)]. A 65 mL de esta solución se agregó 390 µL de persulfato de amonio al 10% (APS) y 44 µL de N,N,N2 ,N1 -tetrametil-etilendiamino (TEMED).

Previo a la corrida electroforética, se realizó una pre-corrida de la matriz a una potencia constante de 60 watt (W), durante aproximadamente 30 min, hasta que el gel alcanzó una temperatura de 50 °C. Se utilizó 0,5 X de amortiguador TBE en el reservorio

superior de la cuba y 1 X de amortiguador TBE en el reservorio inferior. Luego de la pre-corrida, se lavaron las calles para eliminar la urea depositada.

Previo a la siembra, los productos de la amplificación fueron mezclados con 5 µL del amortiguador de carga (0,06 % de azul de bromofenol, 9 % de formamida y 20 mM de EDTA). Luego las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 min e inmediatamente se colocaron en hielo. Se cargaron 5 µL de cada muestra desnaturalizada en cada una de las calles del gel y se realizó la corrida electroforética a una potencia constante de 60 W por 1 1/2 h.

Cuando se realizó la siembra para verificar los polimorfismos entre los parentales, se incluyó una muestra de un marcador de peso molecular (100-bp ladder) para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada MM-SSR.

Para el análisis de los patrones de bandas de la familia F₂ segregante, como la misma presentaba más de 68 individuos (capacidad máxima de la cuba), para cada MM-SSR después de la primera siembra, se realizó la corrida electroforética durante 40 min y luego se sembraron las muestras restantes en la misma matriz. Desde la segunda siembra, la corrida electroforética se realizaba a una potencia constante de 60 W por 1 1/2 h.

Finalizada la corrida electroforética se procedió a la visualización de los MM-SSR utilizando el método descrito en el manual técnico del “DNA Silver Staining System” (Promega) para tinción de geles de secuencia con nitrato de plata. Los pasos que se siguieron se detallan a continuación:

- 1-) Fijación del gel en ácido acético glacial al 10 % v/v durante 20 min con agitación suave.
- 2-) Tres lavados con agitación suave, de 2 min cada uno, con agua tri-destilada.
- 3-) Tinción durante 30 min con agitación suave de una solución de nitrato de plata conformada por: nitrato de plata 0,1 % p/v de agua tri-destilada y 0,05 % v/v de formaldehído.
- 4-) Lavado con agua tri-destilada durante 10 segundos.
- 5-) Revelado con una solución de: carbonato de sodio 3 % p/v, 0,05 % de formaldehído y 2,5 mg / L de tiosulfato de sodio. Agitación suave hasta la observación de bandas.
- 6-) Detención de la reacción con ácido acético glacial al 10 % por 2 min.
- 7-) Lavado con agua tri-destilada.
- 8-) Secado en estufa a 65 °C.

Una vez finalizada la tinción con nitrato de plata, los patrones de bandas se analizaron directamente en los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca.

Búsqueda de polimorfismos y análisis de la segregación de los marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) en la población F₂ J14

Los ensayos moleculares comenzaron con la búsqueda de polimorfismos genéticos entre los parentales FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga) de la población segregante F₂ J14. Para ello se analizaron los 46 pares de cebadores citados anteriormente. Aquellos MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales, fueron luego utilizados para el genotipado de los 130 individuos seleccionados al azar de la población segregante.

Debido a que la población de mapeo fue generada a partir del cruzamiento entre genotipos homocigotas, la segregación esperada para los MM-SSR fue: 1A: 2H: 1B, ya que estos marcadores son de tipo codominantes; siendo A: la banda proveniente del parental oblongo, B: la banda proveniente del parental lanceolado y H indicaba la presencia de ambas bandas correspondiente a los individuos heterocigotas. Para verificar si la segregación genotípica observada para cada uno de los MM-SSR polimórficos se ajustaba a la esperada (1:2:1) se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrado (χ^2).

Análisis de ligamiento

Una vez analizada la segregación de cada uno de los MM-SSR en la población F₂ J14 (análisis genotípico) y con los datos fenotípicos, se procedió a realizar el análisis de ligamiento entre los marcadores y el gen que determina el carácter forma de hoja. Para ello, se confeccionaron los archivos de datos conteniendo los resultados, utilizando la codificación específica del programa de mapeo empleado (MapMaker/Exp 3.0; Lander et al., 1987).

Aquellos MM-SSR que presentaron distorsión en la segregación se eliminaron de los datos para el mapeo.

Para determinar el ligamiento entre los MM-SSR y el gen de interés, el programa MapMaker/Exp 3.0 estima la distancia genética entre ellos y calcula la probabilidad de que se encuentren ligados para un valor de LOD umbral determinado. Si el valor de LOD es mayor que el umbral y la distancia menor a la prefijada, se considera que los MM están ligados. El valor umbral de LOD fijado fue de 3,0 y la distancia máxima de mapeo de 50 cM.

Además, el programa utiliza el valor de LOD para comparar diferentes órdenes posibles entre varios MM y el gen y estima los valores de recombinación a través del método máxima verosimilitud (Fisher y Bhai Balmukand, 1928). Por otro lado, se utilizó la función de Kosambi (Kosambi, 1943), para convertir las frecuencias de recombinación en valores de distancias genéticas.

Finalizado el análisis, se comparó el orden y las distancias de los MM-SSR del GLM obtenido con el programa MapMaker/Exp 3.0, con el del GLM I del mapa consenso de la soja presente en la base de datos de SoyBase (basado en Song et al., 2004).

El mapa de ligamiento genético se confeccionó con el programa MapChart (Voorrips, 2002).

II.1.4. RESULTADOS

Caracterización fenotípica de los parentales y de la población F_2 J14. Análisis de segregación

Para la caracterización fenotípica de las distintas generaciones filiales, por un lado se calculó el IFH para los parentales (FV-L4D y FV-O2B), los individuos F_1 , producto de los cruzamientos entre dichos parentales y los individuos de la población segregante F_2 . Por otro lado, se realizó una clasificación visual de los individuos de la población F_2 y familias $F_{2:3}$, caracterizándolos por su morfología foliar en lanceolados y oblongos.

El IFH del parental FV-L4D (lanceolado) difirió significativamente al del parental FV-O2B (oblongo) (2,6 y 1,6, respectivamente, $P < 0,0001$). Por otra parte, los individuos F_1 presentaron un IFH similar al del parental oblongo (FV-O2B) (Tabla 11).

En la población F_2 , las mediciones del IFH no permitieron diferenciar a los individuos homocigotas dominantes de los heterocigotas, dado que presentaban valores para dicha variable que se superponían. Por lo tanto, para establecer su genotipo se consideraron los resultados del ensayo de progenie $F_{2:3}$. Una vez caracterizado genotípicamente cada individuo F_2 a partir del fenotipo de las familias F_3 se agruparon a los individuos en tres categorías (lanceolados, heterocigotas y oblongos), y se calculó para cada una de ellas un IFH promedio (Tabla 11). Luego se compararon los valores de IFH entre los tres grupos genotípicos, encontrándose diferencias significativas entre ellos ($P < 0,001$). Sin embargo, los rangos de IFH para cada grupo fueron: 2,1-2,9, para los genotipos lanceolados (ln/ln), 1,4-2,0, para los genotipos heterocigotas (Ln/ln) y 1,3-1,9, para los genotipos oblongos (Ln/Ln), por lo que en la práctica la superposición en los rangos de los genotipos heterocigotas y homocigotas dominantes determinó que el IFH no fuera efectivo para poder discriminarlos claramente en la generación F_2 .

En la Figura 15 se observa la forma característica de los folíolos lanceolados, oblongos y de folíolos obtenidos de individuos heterocigotas.



Figura 15. Representación de folíolos lanceolados (imagen izquierda), folíolos obtenidos de individuos heterocigotas (imagen del centro) y folíolos oblongos (imagen derecha).

En la Tabla 10 se detallan, para cada generación caracterizada, el número de individuos analizados, los valores medios del IFH y su respectivo desvío estándar.

Tabla 11. Valores medios y desvío estándar para el índice de forma de hoja (IFH) calculado para los parentales: FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga), individuos F₁ y la población segregante F₂.

Genotipo	N ⁽¹⁾	IFH	Desvío Estándar
FV-L4D	20	2,6	0,2
FV-O2B	20	1,6	0,1
F1	20	1,8	0,1
F2: Lanceolados	108	2,5	0,2
F2: Heterocigotas	256	1,7	0,1
F2: Oblongos	132	1,5	0,1

⁽¹⁾ Número de individuos evaluados.

A partir de los datos fenotípicos de la población F₂ y de las familias F_{2:3} se realizó el análisis de segregación del locus que determina la forma de hoja en la población J14. En la Tabla 12 se muestran los valores observados para cada categoría en cada generación analizada, la proporción esperada para cada una de ellas, considerando la presencia de un gen dominante, el valor de Chi-cuadrado (χ^2) y el valor de probabilidad asociada. En ambas generaciones analizadas, la segregación se ajustó a la esperada para un carácter de herencia monogénica con dominancia completa; esto es, 3(Ln₋):1(ln/ln) para la generación F₂, y 1(Ln/Ln):2(Ln/ln):1(ln/ln) para la generación F_{2:3}.

A partir de los resultados obtenidos se pudo corroborar que, en los materiales utilizados en esta Tesis, la característica forma de hoja lanceolada está regida por un gen simple recesivo.

Tabla 12. Caracterización fenotípica de los parentales FV-L4D (Línea lanceolada), FV-O2B (Línea oblonga), individuos F₁, F₂, familias F_{2:3} y análisis de segregación del locus que rige el carácter forma de hoja en las generaciones segregantes.

Líneas progenitoras y progenies	N° de plantas y familias observadas			Proporción esperada	Bondad de ajuste	
	Lanceoladas	Heterocigotas	Oblongas		χ^2 (c)	P (d)
FV-L4D ^(a)	20	-	-			
FV-O2B ^(a)	-	-	20			
F ₁ ^(a)	-	-	20			
F ₂ ^(a)	108	-	388	1:3	2,75 ns	0,10
F _{2:3} ^(b)	108	256	132	1:2:1	2,84 ns	0,24

^(a) Número de plantas.

^(b) Número de familias.

^(c) Chi-cuadrado (χ^2) obtenido de la segregación del locus correspondiente a la forma de hoja.

^(d) Probabilidad asociada de un valor mayor de χ^2 .

ns: diferencias no significativas entre los valores observados y los esperados ($P \leq 0,05$).

Caracterización molecular

Extracción del ADN genómico.

En la Figura 16 se muestra un ejemplo del análisis de calidad del ADN genómico extraído por el método CTAB (o mini CTAB modificado, descrito en la sección de Materiales y Métodos: Extracción del ADN genómico). En la Figura se observan bandas de alto peso molecular sin presencia de ADN degradado, tanto para las líneas parentales como para los individuos segregantes, indicando que la calidad de las muestras fue buena. La fluorescencia por debajo de las bandas de alto peso molecular corresponden a ARN (ácido ribonucleico), ya que en la técnica de extracción no se utilizaron ARNasas.

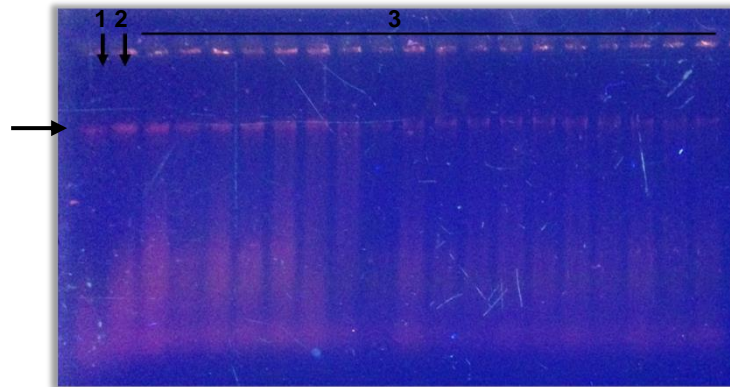


Figura 16. Gel de agarosa al 0,7 % teñido con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) empleado para el análisis de calidad del ADN genómico extraído. En las distintas calles se sembraron diferentes muestras de ADN genómico. 1: muestra de ADN genómico correspondiente al parental FV-L4D, 2: muestra de ADN genómico correspondiente al parental FV-O2B, 3: muestras de ADN genómico obtenidas de individuos de la población F_2 . La flecha indica la banda de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico. La fluorescencia por debajo de las bandas de alto peso molecular corresponde a ARN.

Búsqueda de polimorfismos en marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) entre los parentales de la población F_2 J14

El análisis molecular comenzó con la búsqueda de polimorfismos a nivel de ADN entre las líneas parentales FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga). En total se probaron 46 pares de cebadores situados en el GLM I (Cromosoma 20) de la soja. De los 46 pares de cebadores analizados, 14 MM-SSR resultaron polimórficos (30,4 %), 19 resultaron monomórficos (41,3 %), 4 no amplificaron (8,7 %) y 9 amplificó uno solo de los parentales (19,6 %). Los MM-SSR que resultaron polimórficos e informativos se detallan en la Tabla 13. Los mismos se utilizaron luego para el genotipado de la población segregante F_2 J14, con el objetivo de realizar finalmente el análisis de ligamiento entre ellos y la característica forma de hoja.

Tabla 13. Marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) que resultaron polimórficos entre los parentales FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga).

Marcadores Moleculares Microsatélitespolimórficos (SSR)⁽¹⁾	GLM⁽²⁾
Sat_268	
Sat_418	
Satt354	
Satt292	
Satt148	
GMES0205	
Ln_at004	
Ln_at006	
Ln_at008	
BARCSOYSSR_20_0819	
BARCSOYSSR_20_0829	
BARCSOYSSR_20_0842	
BARCSOYSSR_20_0845	
BARCSOYSSR_20_0847	

⁽¹⁾ SSR: Single Secuence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple".

⁽²⁾ GLM: grupo de ligamiento molecular.

En negrita se resaltan los nuevos MM-SSR que fueron incorporados en este estudio para verificar el grado de ligamiento con el gen que determina la forma de hoja.

De los 14 MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales, seis correspondieron a nuevos marcadores que hasta el momento no se habían utilizado en el mapeo genético del carácter forma de hoja (Tabla 13) y los otros ocho, correspondieron a MM-SSR citados previamente por diversos autores como ligados a dicho carácter (Cregan et al., 1999; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004).

En la Figura 17 se muestran los patrones de bandas de algunos de los MM-SSR que resultaron polimórficos, obtenidos a partir de la separación de los fragmentos amplificados en geles de poliacrialmida de alta resolución. Se observa que, en general, los MM-SSR polimórficos amplificaron solo una banda por genotipo progenitor (monolocus).

Por otra parte, cuando se genotiparon algunos individuos de la población segregante F₂, como los MM-SSR son co-dominantes, se pudieron distinguir los individuos homocigotas de los heterocigotas. En éstos últimos se observaron dos bandas (dos loci), una por cada parental. En general, los fragmentos amplificados por esta técnica tuvieron un tamaño entre 150 y 500 pb.

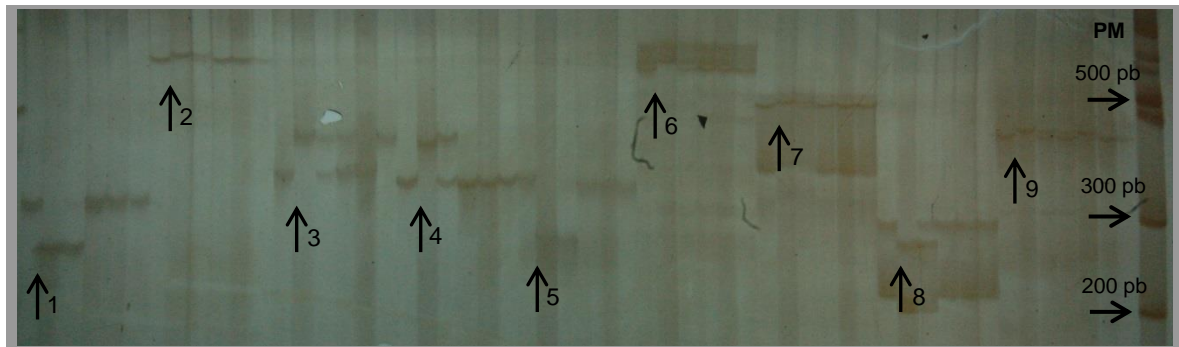


Figura 17. Gel de poliacrilamida (6 %) teñido con nitrato de plata mostrando MM-SSR polimórficos entre los parentales utilizados para el mapeo genético del carácter forma de hoja. Para cada uno de los cebadores SSR ensayados el orden de siembra de los individuos es el mismo: los dos parentales, FV-L4D (línea lanceolada) y FV-O2B (línea oblonga), y cuatro individuos segregantes de la población F_2 . Se observan los siguientes marcadores polimórficos entre las líneas analizadas: (1) Ln_at006, (2) Ln_at008, (3) Sat_418, (4) BARCSOYSSR_20_0829, (5) BARCSOYSSR_20_0842, (6) BARCSOYSSR_20_0819, (7) BARCSOYSSR_20_0845, (8) BARCSOYSSR_20_0847 y (9) Satt390. PM: marcador de peso molecular (pb: pares de bases).

Análisis de la segregación de los marcadores moleculares microsatélites en la población F_2 J14

Los 14 MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales, se utilizaron en el genotipado de los 130 individuos seleccionados al azar de las 500 plantas que componían la población F_2 J14, analizada feno-genotípicamente. El MM-SSR Satt148 se eliminó del estudio porque no mostró un patrón claro de bandas, aun cuando se probaron distintas condiciones de la reacción de amplificación de PCR.

En la Figura 18 se muestra la segregación del MM-SSR Sat_418 como ejemplo de la segregación de los MM-SSR observada en la población F_2 J14. Dicho MM-SSR presentó una proporción de individuos de: 28 A: 64 H: 37 B. Siendo A: el patrón de banda correspondiente al parental oblongo, H: el patrón de bandas de individuos heterocigotas y B: el patrón de banda correspondiente al parental lanceolado. Se analizó si la segregación observada para dicho marcador ajustaba a la segregación esperada (32.5 A: 65 H: 32.5 B). El valor de Chi-cuadrado (χ^2) obtenido en el análisis fue de 1,26, con un valor de probabilidad asociada $P = 0,53$; por lo tanto no se detectaron diferencias significativas entre los valores observados y los esperados ($P \leq 0,05$), concluyéndose que la segregación del marcador Sat_418 se ajustó a la segregación esperada. Este mismo análisis se realizó para el resto de los MM-SSR.

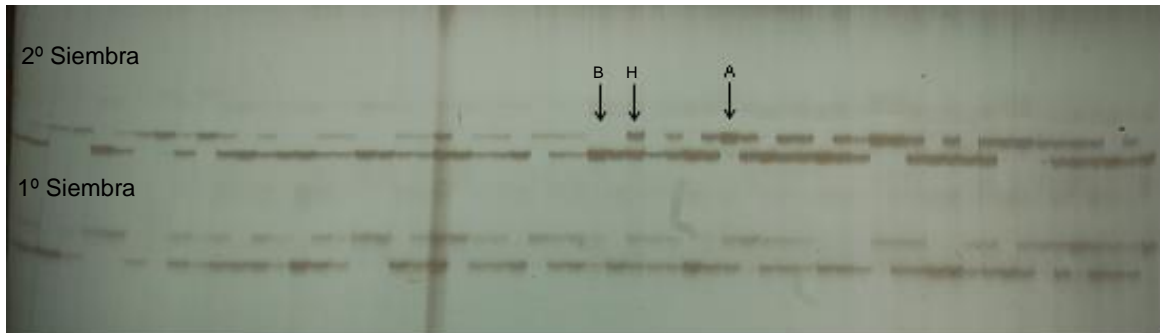


Figura 18. Gel de poliacrilamida (6%) teñido con nitrato de plata mostrando la segregación del MM-SSR Sat_418 en individuos F_2 de la población segregante. El gel fue sembrado dos veces, con diferencia de 45 min (1º: primera siembra; 2º: segunda siembra), con las reacciones de amplificación de los 130 individuos de la población segregante F_2 J14 y de los parentales. En la primera siembra se sembraron 68 individuos y en la segunda 64. Las siglas corresponden A: patrón de banda proveniente del parental oblongo, H: patrón de bandas de individuos heterocigotas y B: patrón de banda proveniente del parental lanceolado.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la segregación de los 13 MM-SSR analizados. Los valores observados de la segregación de todos los MM-SSR se ajustaron a los valores esperados para un marcador codominante evaluado en una generación F_2 (1:2:1), con un valor de probabilidad asociada de $P > 0,05$.

Una vez verificada la segregación de todos los MM-SSR, en la etapa siguiente se realizó el análisis de ligamiento entre el gen que determina la forma de hoja y los MM-SSR analizados.

Tabla 14. Segregación observada de los marcadores moleculares microsatélites (MM-SSR) que resultaron polimórficos entre los parentales FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga) analizados en la población F₂J14 (n = 130).

MM-SSR	Valores Observados ^(a)			Proporción Esperada	χ^2 ^(b)	P ^(c)
	A	H	B			
Sat_268	33	68	29	1:2:1	0,52	0,77
Ln_at006	32	68	30	1:2:1	0,34	0,84
Ln_at008	32	68	30	1:2:1	0,34	0,84
BARCSOYSSR_20_0829	32	67	31	1:2:1	0,14	0,93
BARCSOYSSR_20_0842	32	68	30	1:2:1	0,34	0,84
Sat_418	28	64	37	1:2:1	1,26	0,53
BARCSOYSSR_20_0819	32	66	32	1:2:1	0,03	0,98
BARCSOYSSR_20_0845	32	69	29	1:2:1	0,63	0,73
BARCSOYSSR_20_0847	32	68	29	1:2:1	0,52	0,77
GMES0205	33	68	29	1:2:1	0,52	0,77
Satt292	26	62	41	1:2:1	3,68	0,16
Satt354	28	74	27	1:2:1	2,81	0,24
Ln_at004	20	53	27	1:2:1	1,34	0,51

^(a) A: patrón de banda proveniente del parental oblongo, H: patrón de bandas de individuos heterocigotas y B: patrón de banda proveniente del parental lanceolado.

^(b) Valor de Chi-Cuadrado (χ^2) obtenido del análisis de la segregación observada para cada MM-SSR con respecto a la segregación esperada para un marcador codominante (1:2:1) (Para la población analizada, n = 130, los valores esperados fueron: 32,5: 65: 32,5).

^(c) Valor de probabilidad asociada al valor de Chi-Cuadrado obtenido ($P \leq 0,05$).

Análisis de ligamiento

Una vez caracterizada la segregación individual de los MM-SSR en la población F₂J14, se procedió a analizar la segregación conjunta con los datos fenotípicos del carácter forma de hoja, para así evaluar el ligamiento de los marcadores al gen *Ln*. Para ello, se calcularon las frecuencias de recombinación, se estableció el orden más probable de los MM-SSR y se procedió a la construcción del GLM con el software MapMaker/Exp 3.0 (Figura 19).

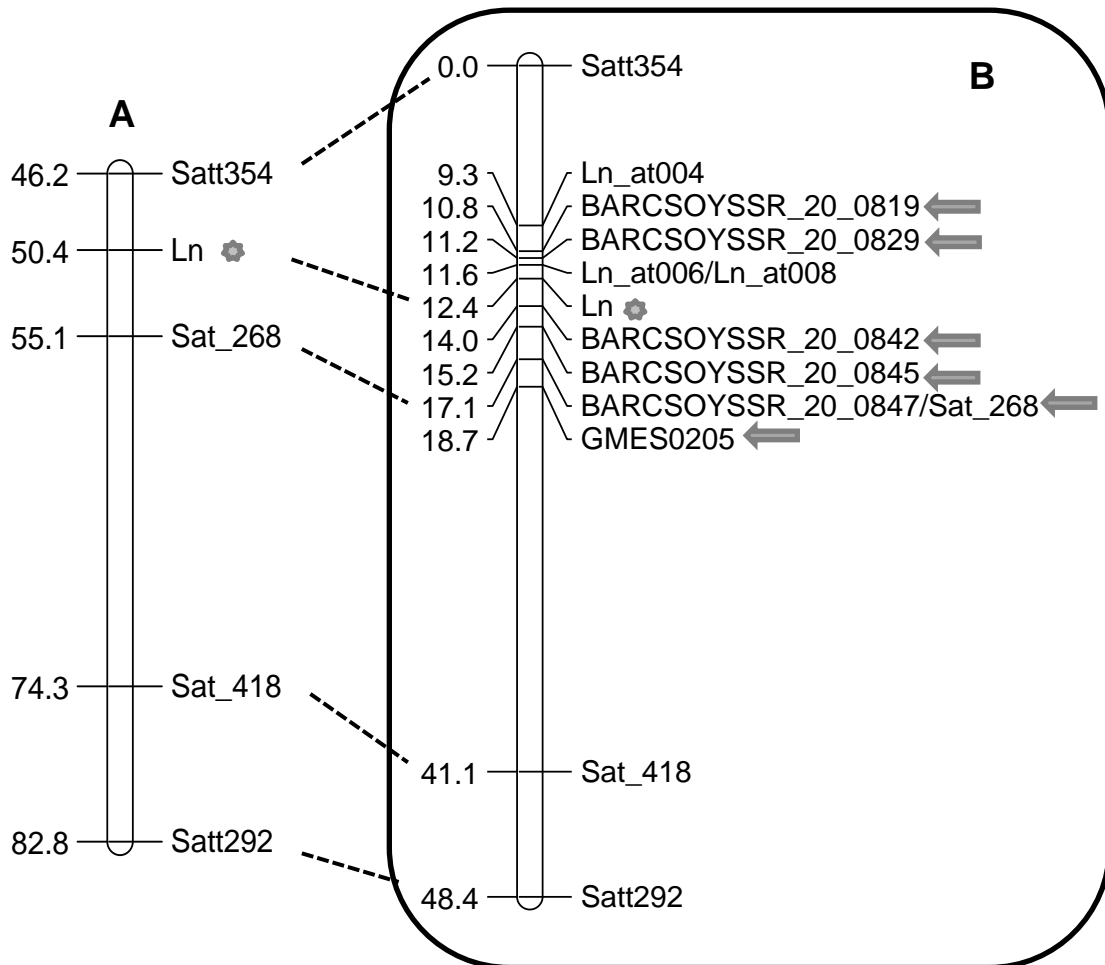


Figura 19. A. Mapa consenso del GLM I del mapa genético de soja obtenido de la base de datos de SoyBase (basado en Song et al., 2004). **B.** Mapa de ligamiento genético sugerido por el programa MapMaker/Exp 3.0 de la región genómica que contiene el gen que regula la forma de hoja, obtenido a partir de la caracterización fenotípica de la población F_2 J14 de 130 individuos obtenida del cruzamiento entre FV-L4D (Línea lanceolada) y FV-O2B (Línea oblonga). Dicho mapa contiene MM-SSR pertenecientes al GLM I y el gen que regularía la morfología foliar. Las distancias genéticas (cM) fueron calculadas usando la función de Kosambi y se colocaron hacia el lado izquierdo de ambos mapas. Las flechas indican los nuevos MM-SSR que resultaron ligados al gen *Ln*. El símbolo de la estrella marca la ubicación del gen *Ln* en los dos mapas de ligamiento. Las líneas punteadas unen MM-SSR en común entre los dos mapas.

Los 13 MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales se encontraron ligados ($LOD > 3$) al gen *Ln*. Seis de ellos se ubicaron a uno de los lados de dicho gen, y los otros siete se localizaron hacia el otro lado (Figura 19 B). El grupo de ligamiento obtenido a partir del análisis tuvo una longitud de 48,4 cM y quedó delimitado por los MM-SSR Satt354 y Satt292. De la comparación entre la longitud del fragmento obtenido, con la longitud del GLM I del mapa consenso de la soja presente en la base de datos de SoyBase

(<http://soybase.org>), se pudo observar para esa misma región una longitud de fragmento similar (36,6 cM; Figura 19 A).

Se mapearon seis MM-SSR nuevos próximos al gen *Ln*: BARCSOYSSR_20_0818, BARCSOYSSR_20_0829, BARCSOYSSR_20_0842, BARCSOYSSR_20_0845, BARCSOYSSR_20_0847 y GMES0205. De todos ellos, los más próximos al locus *Ln* fueron: BARCSOYSSR_20_0829 localizado a una distancia de 1,2 cM (LOD = 51,6) hacia el lado del marcador Satt354 y BARCSOYSSR_20_0842 ubicado a una distancia de 1,6 cM (LOD = 49,7) hacia el lado del marcador Satt292 (Figura 19 B).

Considerando todos MM-SSR evaluados, es decir, incluyendo los marcadores que en estudios anteriores habían sido encontrados como ligados al carácter forma de hoja, se pudo observar que del lado del MM-SSR Satt354, los MM-SSR más próximos al gen fueron *Ln_at006* y *Ln_at008* (que en la población utilizada en ésta Tesis, cosegregaron) situados a una distancia de 0,8 cM (LOD = 53,3); pero del lado del marcador Satt292, el MM-SSR BARCSOYSSR_20_0842 continuó siendo el más cercano (Figura 19 B). De esta manera, para este estudio, se delimitó una región genómica de 2,4 cM en la que se ubicaría el gen que regula la forma de hoja (*Ln*). Teniendo en cuenta el posicionamiento físico de los MM-SSR (*Ln_at006* (34,73 Mb); *Ln_at008* (34,75 Mb) y BARCSOYSSR_20_0842 (34,84), la región delimitada fue de 90 Kb.

El posicionamiento de los MM-SSR se obtuvo del mapa físico de la soja disponible en la base de datos de SoyBase (<http://soybase.org>) y del trabajo de Jeong et al. (2011).

Los MM-SSR Satt 354, Sat_268, Sat_418 y Satt292, conservaron el mismo orden a lo largo del grupo de ligamiento obtenido comparado con el GLM I del mapa consenso de la soja (Figura 19 A y B). A pesar de mantener el mismo posicionamiento, se detectaron diferencias en las distancias genéticas obtenidas entre los distintos MM-SSR cuando se compararon los dos grupos de ligamiento.

II.1.5. DISCUSIÓN

Normalmente los cultivares de soja (*G. max*) presentan formas de hoja oblonga o lanceolada. Si bien la evaluación de la morfología foliar puede realizarse fenotípicamente, clasificando a las plantas visualmente como lanceoladas u oblongas, dado que existen diferentes tipos de forma de hoja (i.e. con distintas relaciones largo/ancho) se ha desarrollado un IFH (Sawada, 1988) para caracterizar tanto sojas cultivadas (*G. max*), como así también sojas silvestres (*G. soja*) (Chen y Nelson, 2004; Porter, 2000).

En los diferentes estudios en los que se ha utilizado el IFH para sojas cultivadas, se han propuesto diferentes valores para diferenciar a los genotipos lanceolados de los oblongos. Sawada (1988) estableció un valor de IFH de 2,6 para discriminar entre líneas lanceoladas y oblongas. Porter (2000) definió que con valores de IFH inferiores a 1,5 los genotipos eran oblongos y con valores superiores a 2,0 eran lanceolados. Recientemente Krisnawati y Adie (2017) establecieron un límite para diferenciar los genotipos lanceolados de los oblongos de 2,4.

El IFH es un descriptor claro cuando se trata de discriminar entre genotipos recesivos (*ln/ln*, lanceolados) y dominantes (*Ln/Ln*, oblongos), pero como se mencionara en los Resultados, en este estudio fue necesario discriminar tres categorías de individuos: homocigotas recesivos (*ln/ln*, lanceolados), homocigotas dominantes (*Ln/Ln*, oblongos) y heterocigotas (*Ln/ln*, oblongos). Cuando se utilizó el IFH en la generación F_2 solo se pudieron discriminar claramente las categorías que correspondían a los fenotipos oblongos y lanceolados, pero no se pudieron discriminar los genotipos homocigotas dominantes de los heterocigotas en dicha generación. Esto hizo que, para poder discriminarlos inequívocamente, fuera necesario recurrir a la generación $F_{2:3}$. Cuando se categorizaron cada uno de los individuos F_2 utilizando los resultados de la generación $F_{2:3}$ se comprobó que los rangos de IFH de los individuos homocigotas dominantes (1,3-1,9) se superponían con los IFH de los individuos heterocigotas (1,4-2,0), explicando por qué en nuestros materiales, si bien el IFH fue efectivo para separar lanceolados (*ln/ln*) de oblongos (*Ln-*), no sirvió para diferenciar oblongos (*Ln/Ln*) de heterocigotas (*Ln/ln*).

Estos resultados indican que si bien el IFH puede ser muy útil para diferenciar genotipos homocigotas, así como también para caracterizar poblaciones derivadas de genotipos silvestres, en los que la variabilidad en la morfología foliar es mucho mayor (Chen y Nelson, 2004) su uso se encuentra restringido para discriminar en forma temprana a los individuos heterocigotas, tanto en la generación filial F_1 , como en la F_2 , así como también en una retrocruza. Es por ello, que en esos casos es necesario contar con MM que permitan discriminar a los individuos heterocigotas en generaciones tempranas para evitar la

realización de ensayos de progenie que aumentarían los tiempos y los costos de todo el proceso.

En los materiales utilizados en esta Tesis, el análisis de segregación del carácter forma de hoja en las generaciones F_2 y $F_{2:3}$, permitió corroborar que la forma de hoja lanceolada está regida por un gen simple recesivo. Para poder incorporar un gen recesivo en un programa de mejoramiento se requiere de una metodología simple y confiable que permita discriminar en generaciones tempranas plantas que presenten el alelo recesivo. Una de ellas consiste en el empleo de MM asociados al locus que rige el carácter de interés. Cuanto más ligados se encuentren los MM al locus en estudio, menor va a ser la posibilidad de recombinación entre ellos, y mayor su utilidad en los programas de mejoramiento. Para poder identificar dichos MM se requiere de la construcción de mapas de ligamiento genético de alta resolución. Para la construcción de los mismos el empleo de MM-SSR, sigue siendo actualmente una herramienta de gran utilidad debido, entre otras cosas, a la hipervariabilidad que presentan, su naturaleza multialélica, herencia codominante, reproducibilidad, su gran abundancia y amplia cobertura del genoma y por sobre todo porque presentan una localización específica en los cromosomas (Kalia et al., 2011). Por otro lado, actualmente, se dispone de un gran número de MM-SSR que surgieron a partir de la secuenciación del genoma de la soja, disponibles en las bases de datos BARCSOYSSR_1.0 (Song et al., 2010; 2016) y Soybase (<http://soybase.org>). La base de datos de Song et al. (2010) cuenta con la posición física y la secuencia de más de 33.000 MM-SSR. Estos avances en el conocimiento del genoma de la soja han sido sin duda una gran ayuda para el mapeo genético de alta resolución de genes y/o QTLs.

A partir del análisis de los datos feno-genotípicos en conjunto con los datos moleculares se lograron identificar 13 MM-SSR ligados al gen que regula el carácter forma de hoja. De esos 13 MM-SSR, Satt354, Ln_at004, Ln_at006, Ln_at008, Sat_268, Sat_418 y Satt292 habían sido previamente identificados como marcadores ligados al gen *Ln*, que es el gen que regula la morfología foliar en sojas cultivadas (Cregan et al., 1999; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004). Por lo tanto, a partir de estos resultados, se pudo demostrar en primera instancia que el gen que regula la forma de hoja lanceolada en el parental FV-L4D, utilizado para la obtención de la población de mapeo, corresponde a un alelo del gen *Ln*, citado previamente en la literatura, localizado en el GLM I (Cromosoma 20) de la soja.

Adicionalmente, se encontraron seis MM-SSR nuevos ligados al gen *Ln* (BARCSOYSSR_20_0819, BARCSOYSSR_20_0829, BARCSOYSSR_20_0842, BARCSOYSSR_20_0845, BARCSOYSSR_20_0847 y GMES0205). Lo interesante de estos seis marcadores es que no solo permitieron mejorar el posicionamiento del gen *Ln* en la

población de mapeo caracterizada en esta Tesis, sino que además, tres de ellos (BARCSOYSSR_20_0819, BARCSOYSSR_20_0829 y BARCSOYSSR_20_0842), no habían sido aún analizados experimentalmente. Estos tres MM-SSR amplificaron un producto simple y polimórfico en los materiales evaluados en este estudio lo que permitió usarlos para el análisis de ligamiento. Esto último está relacionado con que si bien se han identificado más de 33.000 MM-SSR, a partir de la secuenciación del genoma de la soja, no todos ellos han sido analizados experimentalmente. De hecho, en el trabajo de Song et al. (2010), de los 33.000 MM-SSR solo se probaron 1034. Por lo tanto, los MM-SSR BARCSOYSSR_20_0819, BARCSOYSSR_20_0829 y BARCSOYSSR_20_0842 serán de gran utilidad no solo para la selección de genotipos que porten el gen *Ln*, sino también, para realizar nuevos análisis de ligamiento con otros caracteres de interés presentes en el GLM I, como podría ser la característica NPSV, que muchas veces se presenta asociada con la morfología foliar.

Lo relevante de los resultados presentados en esta sección fue que, tanto la validación de los MM-SSR (Satt354, Ln_at004, Ln_at006, Ln_at008, Sat_268, Sat_418 y Satt292), como así también la identificación de nuevos MM-SSR ligados al gen *Ln*, se realizó sobre un fondo genético agronómicamente competitivo, lo que facilita su utilización en un programa de fitomejoramiento orientado a la incorporación del gen lanceolado a germoplasma elite de soja.

El locus *Ln* quedó delimitado finalmente por los MM-SSR Ln_at006 y Ln_at008 localizados hacia un lado del gen y por el MM-SSR BARCSOYSSR_20_0842, situado hacia el otro lado (Figura 19). Estos MM-SSR permitieron delimitar una región de 2,4 cM o 90 Kb en la que se ubicaría el gen que regula la forma de hoja. Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos por Jeong, et al. (2011), se observó que dichos autores lograron delimitar una región más estrecha conteniendo al gen *Ln* de 0,7 cM o 66 Kb. A pesar de que en dicho trabajo se logró delimitar una región más pequeña, es importante resaltar, que de los nueve MM-SSR desarrollados por los autores solo tres pudieron ser utilizados para el mapeo genético del carácter forma de hoja en la población utilizada en ésta Tesis, dado que los seis restantes no amplificaron o amplificaron en uno solo de los parentales. Además, de los tres MM-SSR que amplificaron, se observó por un lado, una inversión de los MM-SSR Ln_at006 y Ln_at008. En este estudio dichos MM-SSR quedaron ubicados hacia el lado del MM Satt354 (Figura 19 B). En cambio, en el GLM obtenido por Jeong et al. (2011), se ubicaron hacia el otro lado del gen *Ln*. Por otra parte, para los tres MM-SSR se observaron diferencias en las distancias genéticas en relación al gen *Ln*. Ln_at004 se mapeo en este trabajo a 3,1 cM del gen *Ln*, mientras que en la población

desarrollada por Jeong et al. (2011) se ubicó a una distancia de 0,5 cM. A su vez, los MM Ln_at006 y Ln_at008 se ubicaron a 0,8 cM del gen *Ln* en el mapa obtenido en esta tesis y a 0,2 cM en el trabajo citado anteriormente.

Las mismas diferencias en las distancias genéticas fueron observadas cuando se compararon los MM-SSR Satt354, Sat_268, Sat_418 y Satt292 en el GLM obtenido en este estudio con el GLM I del mapa consenso de soja presente en la base de datos de SoyBase (Figura 19).

Las diferencias observadas en el posicionamiento de los marcadores así como también en las distancias genéticas entre ellos para los distintos mapas evaluados (el confeccionado en esta Tesis, el de Jeong et al. 2011 y el presente en la base de datos de Soybase), son esperables ya que se utilizaron poblaciones de mapeo diferentes, con distintos tamaños poblacionales y originadas a partir de diversos parentales. Estas características determinan que en muchos casos las frecuencias de recombinación entre los MM-SSR puedan modificarse. Variaciones en las frecuencias de recombinación a su vez generan cambios en las distancias genéticas entre MM (Hwang et al., 2009).

Por último, el hecho de no haber podido utilizar todos los MM-SSR citados previamente como ligados al gen *Ln* (Cregan et al., 1999; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004), dado que en este estudio no amplificaron o fueron monomórficos; y las diferencias observadas en la posición y en las distancias genéticas de los diferentes loci analizados, demuestra la importancia de validar los MM-SSR identificados como ligados a un carácter en particular, en diferentes fondos genéticos para que luego puedan ser utilizados con éxito en el mejoramiento asistido por MM (Francia et al., 2005).

II.1.6. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta sección permitieron caracterizar tanto fenotípicamente como molecularmente el carácter forma de hoja en un fondo genético de buen comportamiento agronómico.

La caracterización fenotípica de la morfología foliar a través del uso del IFH no fue efectiva para discriminar los individuos heterocigotas en generaciones segregantes tempranas en el fondo genético utilizado en esta Tesis, haciendo necesario el empleo de MM para poder diferenciarlos correctamente.

La caracterización molecular permitió corroborar que el carácter forma de hoja lanceolada en las líneas utilizadas en este estudio para la obtención de las poblaciones de mapeo, está regido por un gen simple recesivo y que dicho gen es un alelo del gen *Ln* citado previamente en la literatura, localizado en el GLM I (Cromosoma 20) de la soja.

Se validaron siete MM-SSR que habían sido previamente identificados como marcadores ligados al gen *Ln* y se detectaron seis MM-SSR nuevos ligados a dicho gen, que mejoran la ubicación del mismo en el contexto genético utilizado en esta Tesis.

En la población utilizada en este estudio, el gen *Ln* quedó delimitado en una región de 2,4 cM, entre los marcadores *Ln_at006*, *Ln_at008* y *BARCSOYSSR_20_0842*. El hecho de contar con MM-SSR que flanquean cercanamente al gen lanceolado es de suma importancia para asegurar la correcta identificación de los individuos que portan dicho gen.

CAPÍTULO II: SECCIÓN 2

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL CARÁCTER ALTO PORCENTAJE DE VAINAS DE CUATRO SEMILLAS

II.2.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de cualquier programa de mejoramiento es el desarrollo de genotipos con alto rendimiento. En condiciones de cultivo, el rendimiento está sujeto a una fuerte interacción genotipo-ambiente. Este tipo de interacciones influyen en el grado de éxito que los mejoradores logran obtener en los procesos de selección. La respuesta a la selección depende fundamentalmente de dos factores: la intensidad de selección y la heredabilidad del carácter. La heredabilidad es una medida de la importancia relativa de la variación heredable respecto de la variación fenotípica. Es una propiedad de cada carácter y cada población y la utilidad de su estimación radica en su sentido predictivo de la respuesta a la selección. Por lo general, caracteres de alta heredabilidad muestran una mayor respuesta a la selección (Nyquist, 1991).

Por otro lado, la selección fenotípica de cultivares con alelos favorables para distintos caracteres relacionados con el rendimiento requiere de la evaluación de los mismos en múltiples ambientes y/o a través de varios años, lo que incrementa los costos y el tiempo requerido para obtener nuevas variedades (Tatsuya et al., 2009). Afortunadamente el desarrollo de MM ha permitido identificar, localizar y disectar los *loci* que controlan caracteres de herencia cuantitativa facilitando su introgresión en diversos cultivares (Jiang, 2013; Tanksley, 1993).

En soja se han identificado más de 80 QTLs, en más de 20 poblaciones diferentes, relacionados con diversos caracteres asociados a rendimiento, distribuidos en 18 grupos de ligamiento, ubicados principalmente en los grupos C2, M, K y G de acuerdo a la información disponible en la base de datos de SoyBase (<http://www.soybase.org>). Algunos de éstos QTLs están relacionados con caracteres asociados a semillas y vainas tales como: longitud, ancho y espesor de las semillas (Salas et al., 2006), número de vainas por planta (Concibido et al., 2003; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2010), peso de semillas (Dargahi et al., 2014; Mansur et al., 1996; Xu et al., 2011; Zhang et al., 2004). Otros, están asociados a calidad y a resistencia

a

diversos factores bióticos (Bales et al., 2013; Chung et al., 2003; Yuan et al., 2002). Pese al gran número de QTLs identificados solo un número limitado de ellos han podido ser incorporados y utilizados eficientemente en programas de mejoramiento (Funatsuki et al., 2012). Esto se debe a que en la mayoría de los casos dichos QTLs no han sido correctamente validados en diferentes ambientes y menos aún en diferentes fondos genéticos, limitando su uso en la SAM (Fasoula et al., 2004; Kato et al., 2014).

Por otra parte, de todos los QTLs que se han detectado asociados a los diversos componentes de rendimiento, solo un número limitado de ellos han sido relacionados con los caracteres vainas de cuatro semillas así como también con el NPSV.

Los primeros trabajos en los que se estudió el NPSV asociaron este carácter con la forma de los folíolos. Diversos autores observaron que genotipos con forma de hoja lanceolada solían tener más semillas por vaina que genotipos con forma de hoja oblonga (Domingo, 1945; Johnson y Bernard, 1962; Takahashi, 1934; Weiss, 1970). Esto llevó a proponer que el locus que determina la forma de hoja estaría correlacionado con la región genómica que controla el NPSV. Sin embargo, las causas de dicha correlación son controversiales. Algunos autores han sugerido que el carácter forma de hoja lanceolada y el alto NPSV estarían controlados por genes diferentes, y que los mismos se encontrarían ligados. Takahashi (1934), estableció un porcentaje de recombinación entre los genes que determinaban folíolos lanceolados y el alto NPSV del 10 %. Más tarde Domingo (1945) sugirió que el NPSV estaría regulado por unos pocos genes mayores asociados con varios genes menores. Además, en concordancia con el trabajo de Takahashi, estableció que el gen que determinaba la forma de hoja lanceolada estaría ligado con el locus o *loci* que determinaban el alto NPSV, con un porcentaje de recombinación del 9 %. Zhu y Sun (2006) a partir del estudio de una población proveniente del cruzamiento entre una línea mutante de forma de hoja lanceolada que presentaba un 15 % de vainas de cuatro semillas y una línea oblonga que carecía de vainas de cuatro semillas, concluyeron que había una relación de ligamiento entre ambos caracteres (hoja lanceolada y vainas de cuatro semillas).

Por el contrario, Dinkins et al. (2002), Johnson y Bernard (1962) y Weiss (1970), pusieron en duda la teoría de ligamiento planteada inicialmente. Los primeros en hacerlo fueron Johnson y Bernard (1962), quienes sugirieron que el alto NPSV y la hoja lanceolada, presentaban efectos pleiotrópicos del mismo gen, no obstante, los autores no mostraron evidencia experimental que avalara esta inferencia. Más tarde, Weiss (1970), concluyó que la hoja lanceolada generaba un efecto pleiotrópico incrementando la frecuencia de vainas de cuatro semillas, pero que su expresión dependía además de la acción de genes modificantes. A su vez, Dinkins et al. (2002), Jeong et al. (2011) y Sayama et al. (2017),

también sugirieron que el gen *ln* (gen que determina la forma de hoja lanceolada) induciría un fenotipo pleiotrópico incrementando el NPSV.

Hasta el momento no hay evidencia experimental contundente que permita excluir alguna de las dos hipótesis planteadas respecto de las causas genéticas que determinan la asociación existente entre el carácter forma de hoja y NPSV.

Jeong et al. (2011), utilizando una población RC_3F_2 , proveniente del cruzamiento entre dos líneas que diferían en la forma de hoja y en el NPSV, observaron que los caracteres hoja lanceolada y alto NPSV en su población segregaban juntos, siendo el rango de NPSV de la población lanceolada de 2,55 a 2,95, lo que indica que el NPSV máximo de su población fue 2,95. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal indicaban que, en fondos genéticos donde se expresaban mayores valores de NPSV (máximo 3,7) el carácter hoja lanceolada segregaba tanto con bajos como con altos valores de NPSV (rango 2,4-3,7).

En este punto, es importante remarcar, que lo que se considera entonces como alto NPSV va a depender del fondo genético que se esté evaluando. Para las poblaciones utilizadas en esta Tesis, alto NPSV corresponden a valores $\geq 3,6$. Considerando lo expuesto anteriormente, uno de los objetivos de esta Sección fue analizar cómo se asocian los caracteres forma de hoja y NPSV en poblaciones donde se expresan altos porcentajes de vainas de cuatro semillas ($\geq 60\%$) y por consiguiente altos NPSV ($\geq 3,6$).

En este contexto, es importante mencionar, que haber caracterizado tanto fenotípicamente como molecularmente el carácter forma de hoja inicialmente, fue de suma importancia para el análisis conducido en esta Sección de la Tesis. Esto se debe a que la asociación del carácter NPSV se ha establecido con el gen *ln* localizado en el GLM I (Cromosoma 20). Por lo que previamente era necesario determinar si efectivamente los materiales utilizados en esta Tesis presentaban un alelo de dicho gen (*ln*).

Recientemente, algunos autores han caracterizado genéticamente el NPSV a través del estudio de parámetros como la heredabilidad y la variabilidad genética (Guiday et al., 2017; Karasu et al., 2009; Manav y Arora 2017). Sin embargo, como se citó previamente, el número de trabajos en los que se han identificado QTLs asociados con dicho carácter o bien con el número de vainas de cuatro semillas es limitado.

Zhu y Sun (2006) detectaron al MM-SSR Sat_107 perteneciente al GLM E (Cromosoma 15), ligado a 3,2 cM de un locus mutado que aumentaba el porcentaje de vainas de cuatro semillas. Sin embargo, dicho MM solo era eficiente para seleccionar progenies que provenían de cruzamientos en los cuales uno de los parentales era la línea mutante.

Liu et al. (2011) encontraron a través del método de un solo punto (Tanksley, 1993), tres QTLs asociados con el NPSV en los GLM D1a, L y O (correspondientes a los Cromosomas 1, 19 y 10, respectivamente), que explicaron el 13,9, 9,7 y 15,9 % de la variación fenotípica observada, respectivamente. En dicho estudio se utilizaron dos poblaciones de RILs diferentes, que fueron evaluadas en un solo ambiente. Los QTLs identificados, solo se presentaron en una de las poblaciones ensayadas, con lo cual no mostraron consistencia en los distintos fondos genéticos analizados.

Jeong et al. (2011), además de identificar MM-SSR estrechamente ligados al gen *Ln*, utilizaron el mismo método que Liu et al. (2011) para identificar asociaciones entre los MM-SSR localizados en el GLM I (Cromosoma 20) y el carácter NPSV. De los nueve marcadores que encontraron asociados a dicho carácter, el MM-SSR *Ln_atte* fue el que mostró el mayor valor de R^2 explicando el 55 % de la variación fenotípica observada para la característica NPSV. Dicho MM-SSR no solo estuvo asociado con el NPSV sino que además, co-segregó con el gen que regula la forma de hoja. Sin embargo, y como se mencionó antes, el NPSV máximo de la población utilizada por estos autores fue 2,95.

Por último, Yang et al. (2013), identificaron QTLs asociados con el número de vainas de una, dos, tres y cuatro semillas. Para el número de vainas de cuatro semillas, los autores identificaron seis QTLs con efectos principales en los GLM A1, B2 y F (correspondientes a los cromosomas 5, 14 y 13, respectivamente), que explicaron entre el 11 y el 39% de la variación fenotípica observada para dicho carácter. De esos seis QTLs identificados, solo uno, presente en el GLM A1, se mantuvo estable en los distintos ambientes evaluados. Por otra parte, en dicho trabajo no se encontraron QTLs asociados al número de vainas de cuatro semillas en el GLM I que es donde se ha localizado el gen que regula la forma de hoja lanceolada y que ha sido asociado con el mayor NPSV.

Tanto los QTLs detectados por Liu et al. (2011) como así también los identificados por Yang et al. (2013) no se mantuvieron estables en los distintos ambientes y fondos genéticos evaluados. Por otra parte, en el trabajo de Jeong et al. (2011) la caracterización que se realizó del NPSV se efectuó en una sola población y en un solo año, no realizándose ningún tipo de validación de los resultados obtenidos. El hecho de que la información no se haya podido validar en ninguno de los trabajos presentados anteriormente, no solo determina la escasa factibilidad de poder utilizar los MM ligados a los QTLs identificados en la SAM, sino que además dificulta la detección de los genes que podrían estar involucrados en la regulación de los caracteres evaluados.

Por otro lado, un aspecto importante a destacar, es que las poblaciones que se han utilizado para el mapeo genético de los QTLs, se han obtenido a partir del cruzamiento entre

parentales que presentaban < 15 % de vainas de cuatro semillas (Jeong et al., 2011; Liu et al., 2011; Yang et al., 2013; Zhu y Sun, 2006). La elección de los parentales es sumamente importante, ya que si el objetivo es generar un aumento en el número final de semillas de los cultivares actuales por medio de la mejora en el NPSV, es necesario contar con genotipos que presenten un porcentaje de vainas de cuatro semillas superior al 50 % (NPSV > 3,5). La utilización de estos genotipos como parentales de las poblaciones de mapeo permitirán identificar los alelos que incrementan el NPSV y una vez validados, podrán ser utilizados para mejorar este carácter en los cultivares comerciales.

En base a la escasa información disponible de las regiones que estarían involucradas en la regulación del NPSV, y teniendo en cuenta además, que en los estudios en los que se ha evaluado este carácter se han utilizado parentales con bajo porcentaje de vainas de cuatro semillas y por consiguiente bajo NPSV; en esta Sección de la Tesis se realizó un mapeo genético de QTLs asociados al NPSV, partiendo de poblaciones que se obtuvieron a partir de líneas de buen comportamiento agronómico que presentaban un 60 % de vainas de cuatro semillas (NPSV = 3,6). Además, teniendo en cuenta que el objetivo en un futuro es poder utilizar los MM-SSR ligados a los QTLs identificados en esta Tesis en la SAM, los mismos fueron validados en dos ambientes diferentes para comprobar su estabilidad.

Por otra parte, a partir del posicionamiento en el mapa genético de los QTLs asociados al NPSV y del gen que regula la morfología foliar, se buscó determinar cómo se asocian dichos caracteres en el fondo genético utilizado en esta Tesis.

Finalmente, si los QTLs detectados logran ser validados en un futuro, en otros fondos genéticos, podrá realizarse un mapeo de alta resolución de las regiones encontradas, con el fin de identificar los genes que están involucrados en la expresión del alto porcentaje (> 60%) de vainas de cuatros semillas.

II.2.2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

Objetivos Moleculares Específicos

1. Identificar marcadores moleculares microsatélites ligados al carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas en un fondo genético de buen comportamiento agronómico.
2. Identificar las regiones genómicas vinculadas a la expresión del carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas y posicionarlas en los grupos de ligamiento conocidos del mapa genético de soja, como paso inicial para la identificación, aislamiento y clonado de los genes que determinan dicho carácter.
3. Evaluar la asociación de los caracteres forma de hoja y NPSV en un fondo genético donde se expresan altos porcentajes de vainas de cuatro semillas ($\geq 60\%$).

Hipótesis Molecular Específica

1. El grado de asociación entre los caracteres hoja lanceolada y el alto NPSV depende del fondo genético en el que ambos caracteres se expresan.

II.2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Poblaciones segregantes

Como se detalló en el Capítulo II, en la Sección 1, en Materiales y Métodos, la búsqueda de MM-SSR ligados a los QTLs asociados al alto porcentaje de vainas de cuatro semillas se realizó a través de la caracterización de la variable NPSV, por lo tanto de aquí en adelante solo se hará mención a este parámetro. En dicha Sección se explicó además, cómo se obtuvieron las poblaciones F_2 y RILs destinadas a la caracterización fenotípica del carácter NPSV (Figura 14). De las cinco poblaciones que se obtuvieron (J3, J14, J81, N3 y N9), dos de ellas (J3 y J81) se seleccionaron para realizar únicamente una caracterización fenotípica del NPSV de plantas F_2 en condiciones de campo. Las otras tres fueron destinadas a la obtención de las RILs. La población J14, de 519 individuos, se utilizó para realizar la búsqueda de MM-SSR ligados a los QTLs que estarían asociados con el NPSV y las poblaciones N3 y N9 fueron obtenidas para validar en un futuro los QTLs encontrados en esta Tesis.

Las semillas F_6 de la población J14 se sembraron en invernáculo el 27/07/2015. Un mes luego de la siembra se colocaron lámparas de sodio de alta presión de 400 watios entre las 18:00 hs y las 00:00 hs durante un período de 30 días, con el fin de obtener plantas de mayor tamaño y número de semillas para utilizarlas en los ensayos comparativos en el campo. Al final de la estación de crecimiento se cosechó individualmente cada planta, se contabilizaron las vainas de 1, 2, 3, 4 y 5 semillas y se prepararon los sobres para la siembra en el campo en la siguiente campaña (2015/16).

Diseño experimental y experimentos en el campo

La caracterización fenotípica de la variable NPSV se realizó inicialmente sobre poblaciones F_2 (J3 y J81 de 1050 y 1109 individuos, respectivamente). Las mismas se sembraron en el campo el 12/12/2013. La siembra se realizó junto con los parentales bajo una protección con malla antigranizo y con riego suplementario. Para asegurar la emergencia del mayor número de plantas posible, la siembra de estas dos poblaciones se realizó en forma manual, en surcos separados a 0,52 m y a una distancia entre plantas de 0,10 m. A su vez, la $F_{2:3}$ de la población J3, se sembró el 17/12/2014 en surcos progenie de

2 m de largo distanciados a 0,52 m. Los surcos progenie fueron clasificados en función de la morfología foliar en lanceolados, heterocigotas y oblongos.

La población de RILs J14 (destinada al mapeo de los QTLs asociados al NPSV), fue sembrada junto con sus parentales, F1 y recíprocos durante las campañas 2015/16 y 2016/17. Para ambos experimentos se utilizó un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones. Las semillas de las 519 líneas, de los parentales y de los híbridos obtenidos a partir del cruzamiento de dichos parentales, se sembraron en parcelas de 1 surco de 2 m de largo, distanciados a 0,52 m con un espacio entre plantas de 0,10 m. En total se sembraron 20 plantas por parcela. Se utilizó riego suplementario para evitar el déficit hídrico y se controlaron los insectos, enfermedades y malezas durante todo el ciclo del cultivo. Las fechas de emergencia para los dos experimentos fueron: 14/01/2016 para la campaña 2015/16 y 05/01/2017 para la campaña 2016/17.

Caracterización fenotípica de parentales, híbridos y poblaciones segregantes

La caracterización fenotípica de los parentales, híbridos, y poblaciones segregantes J3, J14 y J81, se realizó en el estadio R8 (plena madurez, según escala de Fehr y Caviness, 1977). Como las poblaciones J3 y J81, eran poblaciones F₂, se caracterizaron todas las plantas. En cambio, para la población de RILs J14 se seleccionaron al azar seis plantas de cada parcela para la caracterización fenotípica.

De cada planta se evaluaron el número de vainas de 1, 2, 3, 4 y 5 semillas. Con dichos valores se estimaron los porcentajes de vainas de cada categoría y se calculó el NPSV potencial a través de la ecuación: $[(loc1) \times 1] + [(loc2) \times 2] + [(loc3) \times 3] + [(loc4) \times 4] + [(loc5) \times 5] / \text{número de vainas}$. Se consideraron todos los lóculos, independientemente del estado de desarrollo de las semillas (i.e. lóculos con semillas completamente desarrolladas y lóculos con semillas abortadas).

El recuento de vainas se realizó utilizando un dispositivo semiautomático que disponía de sensores que contabilizaban las vainas de cada categoría y registraban el valor correspondiente en un archivo digital. Dicho dispositivo fue diseñado y construido específicamente para el procesamiento de las diferentes poblaciones analizadas durante el desarrollo de esta Tesis (Anexo, Figura suplementaria 3).

De las 519 líneas sembradas, en una primera etapa se seleccionaron 131 para realizar la evaluación feno-genotípica. Las 131 líneas se seleccionaron respetando las frecuencias de cada categoría de NPSV. Como se informara en la sección anterior, la

cantidad de líneas seleccionadas surgió de tener en cuenta el número de genotipos que se pueden evaluar en los geles de electroforesis de poliacrilamida dados los peines de la cuba electroforética disponible en el laboratorio y realizando una doble siembra de los productos de PCR. En total, en cada campaña se caracterizaron 2438 plantas incluyendo los parentales y los híbridos.

Análisis Fenotípico

Inicialmente se verificó que el carácter NPSV presentara una distribución normal en las poblaciones J3, J14 y J81, mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Para las mismas poblaciones se realizaron además los gráficos de distribución de frecuencias para dicha variable.

Los datos fenotípicos obtenidos de los parentales de la población J14, (FV-L4D y FV-O2B), individuos F1 y los cruzamientos recíprocos fueron comparados utilizando la prueba *t de Student* (Snedecor, 1964). A su vez, para comparar entre los parentales los porcentajes de vainas de cada categoría analizada, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal – Wallis (Kruskal y Wallis, 1952), dado que la distribución de dicha variable no es normal.

Para testear la variabilidad del carácter NPSV en la población de RILs J14, se utilizó un modelo lineal general. El modelo incluyó ambientes (años), bloques anidados en ambientes, genotipos y la interacción genotipo x ambiente. Los ambientes y los bloques anidados en ambientes fueron considerados como factores fijos mientras que los genotipos y la interacción genotipo x ambiente fueron considerados como factores aleatorios (Gitonga et al., 2014). Adicionalmente, para evaluar el efecto del genotipo y del ambiente sobre el carácter NPSV se realizó una regresión entre los valores de NPSV de cada genotipo para los dos ambientes caracterizados. Las medias individuales de cada genotipo fueron comparadas a través del análisis de mínimas diferencias significativas (LSD). Los datos fenotípicos utilizados para el análisis de los QTLs para cada ambiente, correspondieron a las medias aritméticas obtenidas de las tres repeticiones. Dichas medias fueron calculadas con el mismo paquete estadístico (Lu et al., 2013). Los componentes de variancia se calcularon utilizando la sentencia Proc VarComp del programa estadístico SAS University Edition (2017). Los resultados del análisis de los componentes de variancia se utilizaron para cuantificar el tamaño de la variación debida a la interacción genotipo por ambiente relativa a la variación genotípica ($\sigma^2_{GE} / \sigma^2_G$).

La heredabilidad en sentido amplio fue calculada utilizando la siguiente fórmula (Nyquist, 1991):

$$H^2 = \sigma^2_G / [\sigma^2_G + (\sigma^2_{GE} / n) + (\sigma^2_e / r n)]$$

Donde H^2 es la heredabilidad en sentido amplio, σ^2_G es la variancia genotípica, σ^2_{GE} es la variancia de la interacción genotipo x ambiente, σ^2_e es la variancia residual de la parcela, y n y r son el número de ambientes y de repeticiones, respectivamente.

Caracterización Molecular

Extracción del ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de hojas jóvenes totalmente expandidas que se encontraban en el estadio V2-V3 (según escala de Fehr y Caviness, 1977). Las muestras se tomaron a partir de plantas de la población J14 que se encontraban en una generación F_6 . Cada muestra de hoja se tomó por duplicado. Se seleccionaron hojas jóvenes del estrato superior de las plantas a fin de facilitar la extracción y permitir obtener ADN de mejor calidad. Una vez separadas de la planta madre, las muestras fueron inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido, para producir un congelamiento rápido y de esta forma frenar todos los procesos metabólicos que pudieran ocasionar la degradación del material genético. Finalmente, las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de la purificación del ADN.

La metodología empleada para la extracción del ADN genómico, su cuantificación y la evaluación de su integridad se detallaron en el Capítulo II, Sección 1, Materiales y Métodos: Extracción del ADN genómico.

Amplificación de Repeticiones de Secuencias Simples (Microsatélites)

Teniendo en cuenta que el NPSV es un carácter de herencia cuantitativa (Domingo, 1945; Chen, 1998), y que por lo tanto, varios genes podrían estar regulando su expresión, en una primera etapa se realizó una búsqueda sistemática de polimorfismos entre los

parentales utilizados para la obtención de la población J14, intentando lograr la mayor cobertura posible del genoma. El laboratorio de Fisiología Vegetal, actualmente dispone de más de 400 pares de oligonucleótidos cebadores distribuidos en los 20 GLM de la soja. Los MM-SSR disponibles se ubican a una distancia promedio entre sí, de aproximadamente 10 cM, permitiendo que se prueben en promedio unos 20 MM-SSR por GLM (como mínimo 9 y como máximo 56 MM-SSR).

En total se analizaron 362 pares de oligonucleótidos cebadores (Tabla 15). La metodología utilizada para el análisis de los MM-SSR se detalla en Cregan y Quigley (1997), con pequeñas modificaciones y ya fue descrita en el Capítulo II, Sección 1, Materiales y Métodos: Amplificación de Repeticiones de Secuencias Simples (Microsatélites).

Tabla 15. Marcadores moleculares de repeticiones de secuencia simple (MM-SSR) analizados por grupo de ligamiento molecular (GLM), para la detección de polimorfismos entre los parentales de alto y de bajo número promedio de semillas por vaina: FV-L4D y FV-O2B, respectivamente, utilizados para la obtención de la población de RILs J14.

GLM ⁽¹⁾	Marcadores Microsatélites SSR ⁽²⁾
A1	Satt684, Satt276, Satt165, Satt625, Satt042, Satt364, Satt155, Sat_356, Sat_407, Satt385, Sat_267, Satt174, Sat_271, Satt545.
A2	Satt377, Satt378, Satt207, Satt493, Satt315, Satt187, Sat_212, GMENOD2B, Satt424, AW132402, Sat_115, Satt233, Satt327, Sat_382, Satt409, Satt209, Sat_129, Sat_199, Sat_233, Satt089, Satt119, Satt525, Sat_250, Satt508, Satt390.
B1	Sat_270, Satt251, Satt197, Satt519, Satt298, Sct_026, Satt444, Satt359, Satt453.
B2	Sat_342, Satt126, Sat_287, Satt083, Satt416, Satt304, Satt601, Satt318, Sat_230, Satt066, Satt534, Satt063, Satt687, Satt726.
C1	Satt396, Satt399, Satt690, Sct_186, SOYGPATR, Satt194, Sat_337, Sat_140, Satt578, Sat_077, Sat_357, Satt670, Sct191, Satt524, Satt180, BARCSOYSSR_04_0121.
C2	Staga001, Satt227, Satt520, Satt457, Satt170, Satt322, Sat_213, Satt286, Satt277, Satt460, Satt079, Sat_263, Satt307, Sct028, Satt371, Sat_062, Satt281, Satt357, Satt433, Satt681.
D1a	Satt402, Satt184, Sat_353, Satt368, Satt321, Sat_106, Sat_036, Sat_414, Satt071.
D1b	Satt216, Sat_211, Satt296, Sat_135, Satt282, Satt041, Satt703, Satt172, Sat_069, Sat_183, Staga002, Satt634, Satt266, Satt600, Satt428, Satt644, Satt546, Sat_139, Sat_089, Sat_169, Sat_173, Satt005, Satt095, Satt141, Satt157, Satt537, Satt542, Satt558, Satt701, Satt579, Sat_135.
D2	Satt328, Satt135, Satt372, Satt002, Sat_092, Satt528, Satt301, Satt186, Sat_022.
E	Satt384, Satt213, Sat_112, Satt411, Sat_124, Satt691, Satt212, Satt606, Satt355, Satt685, Satt553, Sat_107.
F	Satt252, Satt206, Satt160, Satt374, Satt595, Satt663, Sat_234, Sat_154, Sct033, Satt334, Satt072, Satt144, Satt218, Satt269.
G	Satt309, Satt610, Satt235, Sat_403, Sctt010, Sat_088, Satt505, Satt503, Satt288, Satt612, AF162283, Sct199, Satt191, Sat_117, Sat_064.
H	Satt353, Sat_127, Satt192, Satt541, Satt253, Sat_158, Satt142, Satt181, Sat_180.
I	Satt562, Satt239, Satt270, Sat_268, Sat_104, Sat_418, Satt292, Satt623, AQ851518, Satt148, Ln_at001, Ln_at003, Ln_at004, Ln_atre04, Ln_atre06, Ln_at006, Ln_at008, Ln_at013, Sat_105, BARCSOYSSR_20_0806, BARCSOYSSR_20_0809, BARCSOYSSR_20_0817, BARCSOYSSR_20_0829, 0831, BARCSOYSSR_20_0842, BARCSOYSSR_20_0850, BARCSOYSSR_20_0853, BARCSOYSSR_20_0819, GMES1146, BARCSOYSSR_20_0845, BARCSOYSSR_20_0847, BARCSOYSSR_20_0782, BARCSOYSSR_20_0895, BARCSOYSSR_20_0832, BARCSOYSSR_20_0840, BARCSOYSSR_20_0798, BARCSOYSSR_20_0860, GMES5938, GMES2409, GMES0205, GMES2648, GMES2001, GMES5714, Satt354.
J	Satt249, Sct_065, Scaa003, Sat_165, Satt215, Sct_001, Sat_093, Sat_366, Satt620, Satt244, Satt431, AW310961, Sctt011, Sct_193, GMES1619, GMES1824, GMES4620, CSSR94, CSSR95, CSTS35, CSTS36, CSTS49, CSTS50, CSTS51, Sat_151, Sat_228, Sat_259, Sat_361, Sat_350, Sat_396, Sat_412, Satt132, Satt183, Satt280, Satt285, Satt380, Satt406, Satt456, Satt529, Satt596, Satt621, Satt622, Satt674, Satt686, Satt547.
K	Sat_119, Satt102, Satt137, Satt381, Satt001, Sat_043, Satt260, Sat_352, Sat_087.
L	Sat_071, Satt398, Satt284, Sat_150, Sct_010, Sat_113, Sat_099, Satt006, Satt373.
M	Satt150, Satt567, Satt245, Satt702, Satt175, Sct_147, Satt677, Satt680, AF186183, BE823543, Satt306, Sat_422, Satt697, Satt551, Sat_121, Satt250, Sat_147, Sat_256, Satt655.
N	Sat_379, Satt152, Satt631, Satt159, Satt009, Satt641, Sat_186, Satt530, Satt683, Satt624, Sat_084, Satt485, Satt125, Satt080, Satt387, Sat_236, Satt521, Satt549, GMABAB, Sat_091, Sat_295, Sat_125, Sat_275, Sat_280, Satt234, Satt237, Sct_195.
O	Satt358, Sat_303, Sat_145, Satt420, Satt345, Satt563, Sat_242, Satt331, Sat_274, Sat_109, Sat_190.

Continuación Tabla 15:

⁽¹⁾ GLM: Grupo de Ligamiento Molecular

⁽²⁾ SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple". Marcadores Microsatélites.

Separación de los productos de amplificación y visualización por tinción con nitrato de plata.

La metodología utilizada para la separación de los productos de amplificación y su visualización por tinción con nitrato de plata se explicó en el Capítulo II, Sección 1, Materiales y Métodos.

QTLs: Métodos para su detección rápida: Análisis de Segregantes en Grupo

Para acelerar la localización de los *loci* asociados al carácter NPSV se utilizó el método de análisis de segregantes en grupo descrito por Michelmore et al. (1991). Para ello se seleccionó el 10% de los individuos más extremos de la distribución de frecuencias del NPSV de las plantas F₆ de la población de RILs J14 (Vikram et al., 2012). Con el ADN de los individuos seleccionados se construyeron dos grupos. Uno de los grupos constituido por los individuos que presentaron los mayores valores de NPSV y el otro grupo, conformado por los individuos que presentaron los menores valores. Es importante destacar que para construir dichos grupos se debe utilizar exactamente la misma cantidad de ADN genómico proveniente de cada individuo que forma parte de los mismos. En este caso se usaron 10 µl de cada muestra caracterizada, de concentración 0,3 µg/µl, cuantificada por espectrofotometría UV a 260 nm.

En este método, la región del genoma que está involucrada en la determinación del NPSV está 20 veces más concentrada (20 corresponde al número de individuos que formaron cada uno de los grupos de ADN) que cualquier otra región o *loci*, que aunque sean polimórficos entre los individuos que componen los grupos se distribuyen y segregan al azar entre ambos grupos. Por este motivo, los MM que resulten polimórficos entre los dos grupos de ADN tienen alta probabilidad de estar ligados a la característica en base a la cual fueron diseñados (Michelmore et al., 1991).

Aquellos MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales se utilizaron posteriormente para identificar polimorfismos entre los grupos de ADN. Los MM-SSR polimórficos entre ambos grupos se utilizaron en un primer momento para genotipar los

individuos que conformaron cada grupo y así visualizar si segregaban de la forma esperada, es decir, aquellos individuos que formaban el grupo de alto NPSV, debían presentar el mismo alelo del marcador que el parental con alto NPSV (FV-L4D) y aquellos individuos que formaban el grupo de bajo NPSV, debían presentar el alelo del otro parental (FV-O2B). Una vez caracterizada la segregación de los individuos de cada grupo, aquellos MM-SSR que presentaron una segregación adecuada se utilizaron en el genotipado de los 131 individuos seleccionados de la población J14.

Detección y análisis de QTLs

Para la detección de QTLs asociados con el NPSV se utilizaron dos metodologías diferentes:

- ✓ Análisis de un solo marcador o de un solo punto
- ✓ Análisis de mapeo por intervalos compuestos

Análisis de un solo marcador

Con los datos obtenidos del genotipado de los 131 individuos de la población de RILs J14 con aquellos MM-SSR que resultaron polimórficos entre los grupos de ADN genómico, se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrado (χ^2) para verificar que la segregación de dichos marcadores se ajustara al modelo de herencia mendeliana característico de una población de RILs estabilizada, para un tipo de marcadores codominantes (segregación esperada 1:1) (Kearsey y Pooni, 1996). Aquellos marcadores que mostraron una segregación distorsionada fueron descartados del análisis.

En una primera aproximación, la asociación entre los MM-SSR y el carácter NPSV se determinó por el método de un solo punto o de un solo marcador (Tanksley, 1993). Para ello, se realizó un ANVA a un criterio de clasificación, en el cual los marcadores se utilizaron como fuentes de variación. Con una probabilidad menor al 5 % en el ANVA se concluye que el marcador se encuentra ligado al QTL que rige el carácter fenotípico. Para realizar los análisis se utilizó el programa estadístico SAS University Edition (2017).

Las regiones genómicas que resultaron asociadas con el NPSV, fueron luego saturadas con MM-SSR adicionales que se seleccionaron a partir de las bases de datos de Soybase (<http://soybase.org>) y BARCSOYSSR_1.0 (Song et al., 2010; 2016).

Para estimar con mayor precisión la posición y el efecto de los QTLs, y aprovechando la mejor cobertura lograda a partir de la incorporación de nuevos MM-SSR, se aplicó el modelo de análisis de mapeo por intervalos compuestos.

Análisis de mapeo por intervalos compuestos

Para realizar este análisis, en una primera etapa se construyó el mapa de ligamiento genético con todos aquellos marcadores que no mostraron una segregación distorsionada. Para ello se incluyeron los primeros MM-SSR que se detectaron asociados al carácter NPSV a través del análisis de un solo marcador, como así también, los nuevos MM-SSR seleccionados para saturar las regiones en las que se detectó la presencia de algún QTL. El análisis de ligamiento entre los marcadores se realizó con el programa MapMaker/Exp 3.0 (Lander et al., 1987). Los marcadores fueron agrupados en diferentes cromosomas utilizando un valor de LOD de 3,0. Para la detección de ligamiento entre los marcadores se fijó un umbral de LOD de 3,0 y una distancia máxima de mapeo de 50 cM. Se utilizó la función de Kosambi (Kosambi, 1943) para convertir las frecuencias de recombinación en valores de distancias genéticas.

El número y letra para cada uno de los GLM obtenidos se asignaron considerando el mapa genético consenso de soja de la base de datos de Soybase (<http://soybase.org>). Finalizado el análisis, se comparó el orden y las distancias de los MM-SSR en los grupos de ligamiento obtenidos con los que están en el mapa consenso citado con anterioridad.

El mapeo por intervalos compuestos (Zeng, 1994) se realizó con el programa WinQTL Cartographer V2.5 (Wang et al. 2011). De los modelos de mapeo por intervalos compuestos se utilizó el modelo 6 estándar. Además se seleccionó el método de regresión hacia adelante y hacia atrás (en inglés: forward y backward), un control de cofactores automático y una ventana de 5 cM. Se fijó una probabilidad de entrada y salida de los marcadores de 0,05 y una velocidad de avance de 5 cM. El valor mínimo de LOD para declarar la existencia de un QTL, se estableció a través de la realización de 1000 permutaciones con un $\alpha = 0,05$ (Churchil y Doerge, 1994).

Además, se realizó un mapeo multicarácter por intervalos compuestos. Este mapeo es una extensión del mapeo por intervalos compuestos que se aplica a varios caracteres o a un mismo carácter medido en distintos ambientes (Jiang y Zeng, 1995). La ventaja que

presenta este tipo de mapeo es que no solo incrementa el poder de detección de QTLs sino que además aumenta la precisión de la posición de los QTLs identificados en el mapa, ya que al trabajar con mediciones de un carácter en dos ambientes equivaldría de manera aproximada a tener medidas repetidas, y ello lleva a una reducción de la variancia residual. Los parámetros que se utilizaron para este análisis fueron los mismos que se fijaron para el mapeo por intervalos compuestos.

Los QTLs detectados fueron nombrados con una letra *q* (de QTL) seguida de las letras *npsv* (número promedio de semillas por vaina) y un número que indicaba la cantidad de QTLs detectados.

Además se estimaron las interacciones epistáticas entre las regiones genómicas que resultaron asociadas con el carácter NPSV. Para ello se aplicó un ANVA a dos criterios de clasificación. Para el análisis se seleccionó por región, el marcador molecular que se detectó más cercano al mayor valor de LOD informado en el mapeo multicarácter por intervalos compuestos. El tipo de interacción que se evaluó en este análisis fue de tipo aditivo-aditivo.

El mapa de ligamiento genético y los intervalos de confianza de los QTLs identificados se confeccionaron con el programa MapChart (Voorrips, 2002). El intervalo de confianza para cada QTL se generó a partir del descenso de 1 unidad de LOD (4,61 unidades de LR) con respecto al pico de LOD máximo de cada QTL.

II.2.4. RESULTADOS

Caracterización fenotípica de los parentales, híbridos y poblaciones segregantes

Los parentales que se utilizaron para la obtención de la población de RILs J14, difirieron significativamente para el carácter NPSV, así como también para cada una de las categorías de vainas analizadas ($P < 0,001$) (Tabla 16). Como se explicó en el Capítulo I, en la Introducción, cuando se caracterizan el número de vainas de cada categoría dentro de una misma planta, por lo general se observa el predominio de dos categorías consecutivas. En la Tabla 16 se puede observar que el parental FV-L4D presentó un predominio de vainas de tres y de cuatro semillas, siendo esta última categoría la que mostró mayor porcentaje. A su vez, los porcentajes de cada categoría quedan reflejados en el NPSV. Para este parental 3,6 significa que en promedio las plantas evaluadas presentaron un 60 % de vainas de cuatro semillas y un 40 % de vainas de tres semillas. Para el parental FV-O2B, se observó un predominio de vainas de dos y tres semillas, siendo la primera categoría la que presentó mayor porcentaje. Para este parental, un NPSV de 2,1 significa que en promedio las plantas analizadas presentaron un 90 % de vainas de dos semillas y un 10 % de vainas de tres semillas.

Tabla 16. Valores promedios para las campañas 2015/16 y 2016/17 del porcentaje de vainas de 1, 2, 3, 4 y 5 semillas y del número promedio de semillas por vaina para los parentales FV-L4D y FV-O2B.

Parentales	Nº ⁽²⁾	Porcentaje de vainas					NPSV ⁽⁴⁾
		1 SPV ⁽³⁾	2 SPV	3 SPV	4 SPV	5 SPV	
FV-L4D ⁽¹⁾	60	0,0 b	1,6 b	40,3 a	57,5 a	0,6 a	3,6 a
FV-O2B	60	0,9 a	85,6 a	13,5 b	0,0 b	0,0 b	2,1 b

⁽¹⁾ FV-L4D parental de alto número promedio de semillas por vaina. FV-O2B parental de bajo número promedio de semillas por vaina.

⁽²⁾ N°: Número de individuos evaluados.

⁽³⁾ SPV: semillas por vaina.

⁽⁴⁾ NPSV: número promedio de semillas por vaina.

Todas las medias analizadas mostraron diferencias significativas $P < 0,001$ entre los parentales. Para la característica NPSV se realizó una prueba *t* de Student. Para los porcentajes de cada categoría dado que la distribución del carácter no fue normal se utilizó el test no paramétrico de Kruskal – Wallis (Kruskal y Wallis, 1952).

Los parentales de la población de RILs J14 también difirieron significativamente en el NPSV respecto de los híbridos obtenidos del cruzamiento entre los mismos ($P < 0,001$;

Tabla 17). En el análisis de las plantas F_1 , se caracterizaron también los cruzamientos recíprocos. A partir de los resultados obtenidos (Tabla 17), se puede inferir que no se detectaron efectos recíprocos a nivel de la F_1 , dado que no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de cruzamientos evaluados (FV-L4D x FV-O2B y FV-O2B x FV-L4D).

Para determinar el grado de dominancia a nivel de la F_1 , el valor promedio de los híbridos se comparó con el promedio de la población de RILs para las dos campañas analizadas. Para ambos años, el valor medio de los híbridos difirió significativamente de la media de la población de RILs ($P < 0,001$), con lo cual, a nivel de la F_1 , se presentó una dominancia parcial de los menores valores (i.e. hacia el parental FV-O2B).

La población de RILs J14, para la campaña 2015/16, presentó un rango de variación del NPSV que estuvo entre 2,1 y 3,8, mientras que para la campaña 2016/17 fue de 2,1 a 3,9. El NPSV promedio para toda la población de RILs en las dos campañas fue de 2,8 (Tabla 17).

Tabla 17. Número promedio de semillas por vaina (NPSV) para los parentales FV-L4D y FV-O2B, híbridos y población de RILs J14 en las dos campañas analizadas 2015/16 y 2016/17. Se detallan además los valores mínimos y máximos y el coeficiente de variación obtenido para la población.

NPSV ⁽¹⁾	Parentales		Híbridos		Población RILs J14			
	Campaña	FV-L4D ⁽²⁾	FV-O2B	F1 (FV-L4D x FV-O2B)	F1 (FV-O2B x FV-L4D)	Media ± D.E.	Mín-Máx ⁽³⁾	CV ⁽⁴⁾ (%)
	2015/16	3,6 a	2,2 c	2,6 b	2,6 b	2,8 ± 0,4	2,1-3,8	
	2016/17	3,5 a	2,1 c	2,6 b	2,7 b	2,8 ± 0,4	2,1-3,9	2,5
	Promedio	3,6 a	2,1 c	2,6 b	2,6 b	2,8 ± 0,4	2,1-3,9	

(1) NPSV: número promedio de semillas por vaina.

(2) FV-L4D parental de alto número promedio de semillas por vaina. FV-O2B parental de bajo número promedio de semillas por vaina.

(3) Mín-Máx valores mínimos y máximos para la variable NPSV.

(4) CV: coeficiente de variación.

Dentro de cada campaña analizada, medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba *t* de Student. ($P < 0,001$)

Se detectó un alto grado de asociación entre los valores de NPSV de cada genotipo de la población de RILs J14 para las dos campañas analizadas ($R^2 = 0,90$; $P < 0,0001$; Figura 20), demostrando el muy bajo efecto que ejerce el ambiente sobre el carácter en estudio. Además, esto fue corroborado por el bajo valor que presentó la relación σ_{GE}^2/σ_G^2 (Tabla 18). Por otra parte, la partición de los componentes de la variancia indicó que el 96 %

de la variabilidad total observada para el NPSV se debió a los genotipos y solo 0,7 % y 1,6 % se debieron al ambiente y a la interacción genotipo por ambiente, respectivamente.

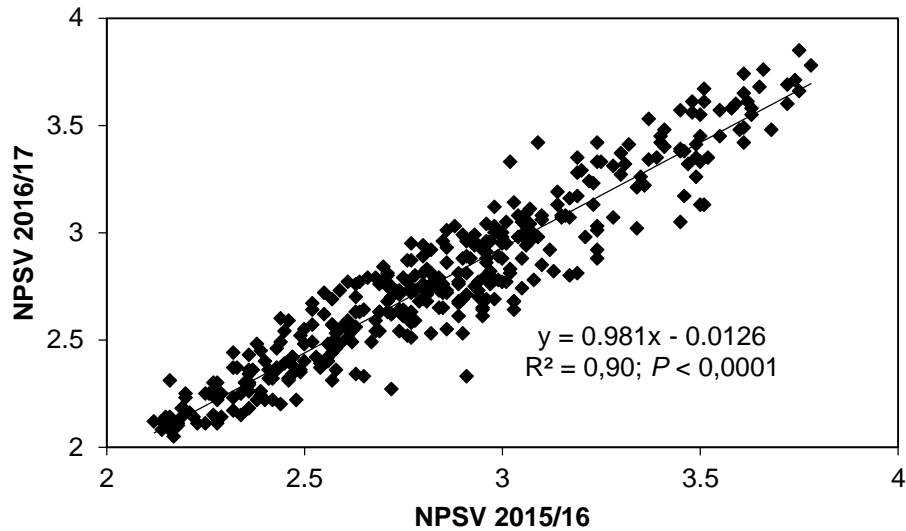


Figura 20. Relación entre los valores de NPSV para cada uno de los genotipos de la población de RILs J14 en las dos campañas evaluadas (2015/16 y 2016/17).

El NPSV presentó un coeficiente de variación bajo (Tabla 17), permitiendo generar una estimación precisa de su heredabilidad (H^2) (Tabla 18). El valor de H^2 calculado para esta característica fue de 0,98, indicando que la mayor parte de la variación fenotípica observada para el NPSV se debió fundamentalmente a la variación genética (principalmente variación aditiva) presente entre los distintos genotipos que conformaron la población de RILs J14, más que a variaciones generadas por el ambiente.

Tabla 18. Componentes de la variancia, relación entre la variancia de la interacción y la variancia genotípica y heredabilidad para el carácter número promedio de semillas por vaina, evaluado en la población de RILs J14, durante las campañas 2015/16 y 2016/17.

Componentes de Variancia		H^2
σ^2_G	0,1473	0,98
σ^2_{GE}	0,0028	
σ^2_e	0,0051	
σ^2_{GE}/σ^2_G	0,0190	

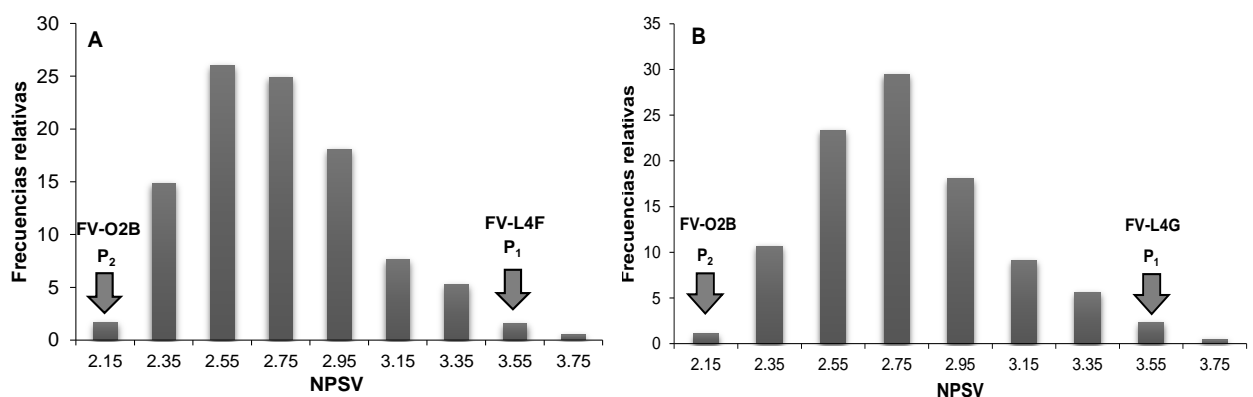
σ^2_G variancia genotípica.

σ^2_{GE} variancia de la interacción genotipo x ambiente.

σ^2_e variancia residual de la parcela.

H^2 heredabilidad en sentido amplio.

El carácter NPSV presentó una distribución normal con valores de W cercanos a uno, en las tres poblaciones analizadas: J3, J14 y J81. Además para las tres poblaciones caracterizadas se observó un amplio rango de variación del carácter, sugiriendo que la herencia del mismo sería poligénica. Con el fin de observar la distribución del NPSV en las poblaciones, se graficaron los histogramas de frecuencia (Figura 21). Los gráficos de las poblaciones J3 y J81, se construyeron con los datos fenotípicos obtenidos de plantas F_2 , mientras que para la población J14 se utilizó para cada genotipo el promedio de las dos campañas. En ninguna de las tres poblaciones analizadas se detectó la presencia de segregantes transgresivos. Por otra parte, la distribución que se observa en las tres poblaciones demuestra la normalidad del carácter.



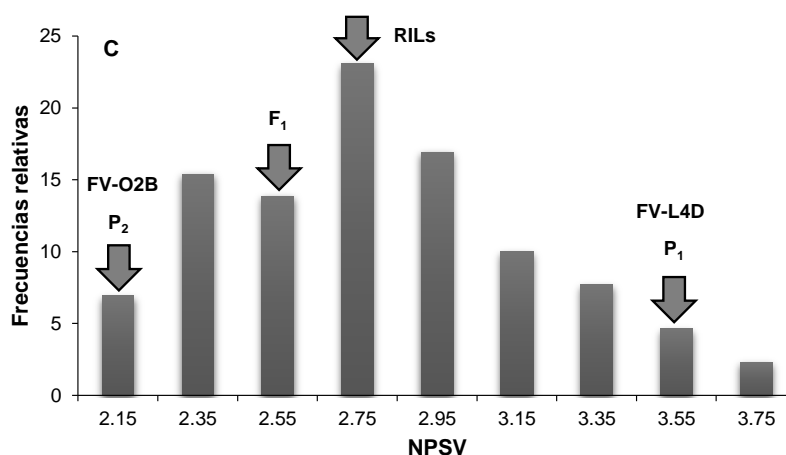


Figura 21. Histograma de frecuencias para el carácter número promedio de semillas por vaina (NPSV). **A.** Población F₂:J3 derivada del cruzamiento entre FV-L4F y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente. **B.** Población F₂:J81 derivada del cruzamiento entre FV-L4G y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente. **C.** Población F₆:J14 derivada del cruzamiento entre FV-L4D y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente. F₁ valor promedio de los híbridos. RILs valor promedio de la población J14 para los dos años evaluados.

Caracterización molecular

Extracción de ADN genómico

En general las muestras de ADN genómico extraído, tanto de las líneas parentales como de los 131 individuos F₆ de la población J14, fueron de buena calidad y no presentaron degradación. Las mismas se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización y para evitar su degradación se prepararon soluciones de trabajo que consistieron en diluciones a partir de la muestra original de concentración final de 20 ng/ul.

Búsqueda de polimorfismos en marcadores moleculares microsatélites, MM-SSR

Para identificar MM-SSR ligados a los QTLs que estarían asociados con el NPSV, el análisis molecular comenzó con una búsqueda sistemática de polimorfismos entre los parentales de la población de RILs J14 (FV-L4D: de alto NPSV y FV-O2B: de bajo NPSV), intentando lograr la mayor cobertura posible del genoma. Para ello se evaluaron 362 pares de oligonucleótidos cebadores distribuidos en los 20 GLM del genoma de la soja. Dichos cebadores, disponibles en el Laboratorio de Fisiología Vegetal fueron obtenidos de los mapas de Cregan et al. (1999), Hisano et al. (2007), Song et al. (2010) y Soybase

(<http://soybase.org>). En promedio se probaron 18,1 MM-SSR por GLM. Los GLM que tuvieron menor número de MM-SSR analizados fueron: B1, D1a, H y L (9 MM-SSR); mientras que el mayor número de MM se evaluaron en el GLM I (46 MM-SSR). Los MM-SSR del GLM I ya habían sido caracterizados previamente, cuando se habían identificado polimorfismos entre los dos mismos parentales para realizar el mapeo genético del carácter forma de hoja en la generación F₂ (Capítulo II, Sección 1, Resultados).

De los 362 pares de cebadores evaluados: 121 (33,4 %) resultaron polimórficos, 197 (54,4 %) fueron monomórficos, 25 (6,9 %) no amplificaron y 19 (5,3 %) amplificó uno solo de los parentales; con lo cual como resultado se obtuvo un 33,4 % de polimorfismo. Todos los grupos de ligamiento presentaron polimorfismos entre los parentales excepto para el GLM D1a. Los MM-SSR que resultaron polimórficos e informativos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Marcadores moleculares de repeticiones de secuencia simple (MM-SSR) polimórficos entre las líneas FV-L4D (de alto número promedio de semillas por vaina) y FV-O2B (de bajo número promedio de semillas por vaina), utilizadas como parentales de la población de RILs J14 para cada uno de los grupos de ligamiento molecular (GLM) analizados.

GLM ⁽¹⁾	Marcadores Moleculares Microsatélites (MM-SSR) ⁽²⁾ polimórficos
A1	Satt165, Satt625, Satt364, Sat_407, Satt174.
A2	Sat_382, Satt409, Satt390.
B1	Sat_270, Satt251, Satt197, Sct_026, Satt444, Satt453.
B2	Sat_342, Satt126, Satt304, Satt534.
C1	Satt690, Sct_186, Satt194, Sat_140.
C2	Staga001, Satt520, Satt457, Sat_213, Satt286, Satt460, Satt079, Sat_263, Satt281, Satt681.
D1a	-
D1b	Satt216, Satt041, Sat_069, Sat_183, Staga002, Sat_139, Sat_089, Satt095.
D2	Sat_092, Sat_022.
E	Sat_112, Sat_124.
F	Satt252, Sat_234, Sct033, Satt334, Satt144.
G	Satt235, Sct010, Satt505, Satt288, Satt612, AF162283.
H	Satt253.
I	Sat_268, Sat_418, Satt292, Satt148, Ln_at004, Ln_at006, Ln_at008, BARCSOYSSR_20_0829, ARCSOYSSR_20_0842, BARCSOYSSR_20_0819, BARCSOYSSR_20_0845, BARCSOYSSR_20_0847, GMES0205, Satt354.
J	Sct_065, Scaa003, Satt215, Sct_001, Sat_366, Satt431, CSSR95, Sat_228, Sat_259, Sat_361, Sat_396, Satt132, Satt285, Satt406, Satt456, Satt596, Satt622, Satt686.
K	Satt102.
L	Satt284, Sct_010, Sat_113.
M	Satt567, Satt245, AF186183, Sat_422, Satt655.
N	Satt631, Satt159, Satt009, Satt641, Satt530, Sat_084, Satt485, Satt080, Satt387, Sat_236, Satt521, Satt549, GMABAB, Sat_295, Sat_125, Sat_280, Satt237.
O	Sat_145, Satt420, Satt345, Satt563, Sat_274, Sat_109, Sat_190.

⁽¹⁾ GLM: Grupo de Ligamiento Molecular

⁽²⁾ SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple". Marcadores Microsatélites.

Cuando se analizaron los patrones de bandas obtenidos a partir de la separación de los fragmentos amplificados en geles de poliacrilamida de alta resolución, se observó que los cebadores amplificaron en general sólo una banda (monocus) por genotipo progenitor (Figura 22). En general, los fragmentos amplificados por esta técnica tuvieron un tamaño entre 150 y 500 pb.

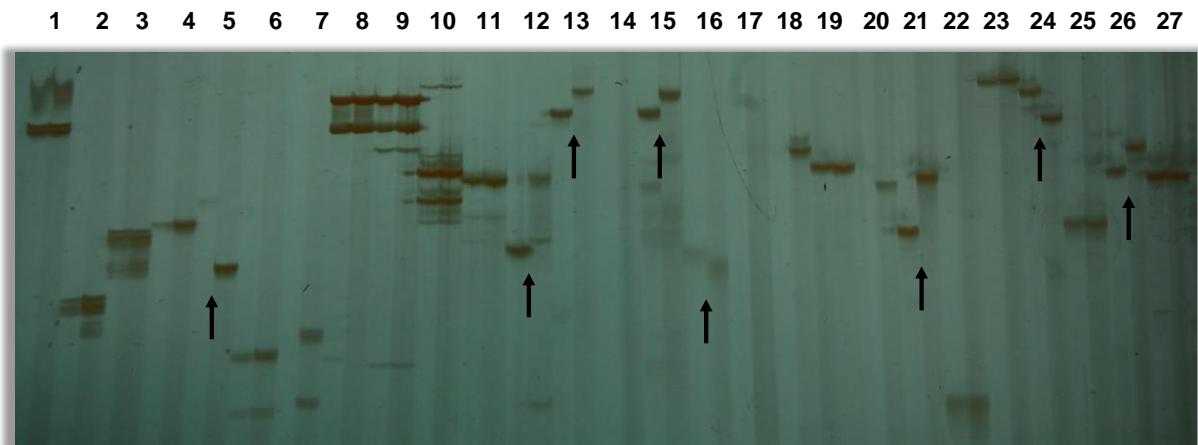


Figura 22. Gel de poliacrilamida (6 %) teñido con nitrato de plata mostrando MM-SSR polimórficos entre los parentales utilizados para la obtención de la población J14. Para cada uno de los cebadores SSR ensayados el orden de siembra de los individuos fue el mismo: FV-L4D (parental de alto número promedio de semillas por vaina) y FV-O2B (parental de bajo número promedio de semillas por vaina). Las flechas muestran los marcadores moleculares que resultaron polimórficos: (5) CSSR95, (12) Sat_228, (13) Sat_259, (15) Sat_361, (16) Sat_396, (21) Sat_285, (24) Satt456, (26) Satt596. Marcadores moleculares monomórficos: (1) GMES1619, (2) GMES1824, (3) GMES4620, (4) CSSR94, (6) CSTS-35, (8) CSTS49, (9) CSTS50, (10) CSTS51, (11) Sat_151, (19) Satt183, (22) Satt380, (23) Satt406, (25) Satt529 y (27) Satt621. No amplificaron: (14) Sat_350 y (17) Sat_412. Amplificó una sola banda: (7) CSTS36, (18) Satt132 y (20) Satt280.

QTLs: Método para su detección rápida: Análisis de Segregantes en Grupo

Con el fin de acelerar la detección de los QTLs asociados con el NPSV se aplicó la técnica de análisis de segregantes en grupo (Michelmore et al., 1991). Los 121 MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales, se utilizaron luego para detectar polimorfismos entre los grupos de ADN caracterizados como de alto y bajo NPSV. Por cada MM-SSR se analizaron los parentales, los dos grupos de ADN genómico y un individuo con alto y otro con bajo NPSV.

Se detectaron 18 MM-SSR polimórficos entre los dos grupos de ADN, de los cuales 13 correspondían al GLM I (Satt354, Ln_at004, Ln_at006, Ln_at008, Sat_268, GMES0205, Sat_418, Satt292, BARCSOYSSR_20_0819, BARCSOYSSR_20_0829, BARCSOYSSR_20_0842, BARCSOYSSR_20_0845 y BARCSOYSSR_20_0847) y los otros cinco se encontraron, dos en el GLM L (Sat_113 y Sct_010) y tres en el GLM F (Satt252, Sat_234 y Satt144) (Figura 23).

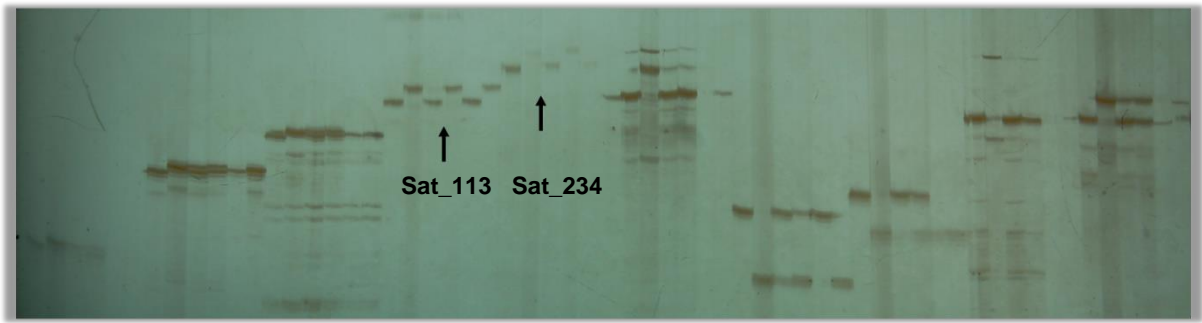


Figura 23. Gel de poliacrilamida (6 %) teñido con nitrato de plata mostrando MM-SSR polimórficos usando la técnica de análisis de segregantes en grupo. Para cada marcador se sembraron: los parentales: FV-L4D (parental de alto número promedio de semillas por vaina) y FV-O2B (parental de bajo número promedio de semillas por vaina); los grupos de ADN genómico: primero se sembró el grupo de alto número promedio de semillas por vaina y luego el de bajo; y finalmente, se sembraron dos individuos: uno de alto y otro de bajo número promedio de semillas por vaina. Los marcadores que resultaron polimórficos entre los grupos de ADN (Sat_113 y Sat_234) están identificados con dos flechas; el resto corresponden a marcadores que resultaron monomórficos entre los grupos de ADN.

Con el objetivo de determinar si los MM-SSR estaban realmente asociados al NPSV, se genotiparon independientemente todos los individuos que formaban los dos grupos de ADN (Figura 24). Se obtuvo un 75 % de coincidencia en promedio para los 18 MM-SSR analizados. Esto significa que, cuando se evaluó el genotipo de los individuos que formaban el grupo de ADN de alto NPSV, el 75 % de los mismos mostraron el mismo alelo que el parental de alto NPSV (FV-L4D); y lo mismo ocurrió con el grupo de ADN de bajo NPSV, es decir, el 75 % de los individuos que componían dicho grupo de ADN, presentaron el mismo alelo que el parental de bajo NPSV (FV-O2B).

La aplicación de esta metodología permitió identificar al menos tres regiones en las que se encontrarían QTLs asociados con la característica NPSV. A continuación los 18 MM-SSR se utilizaron para el genotipado de los 131 individuos de la población de RILs J14.

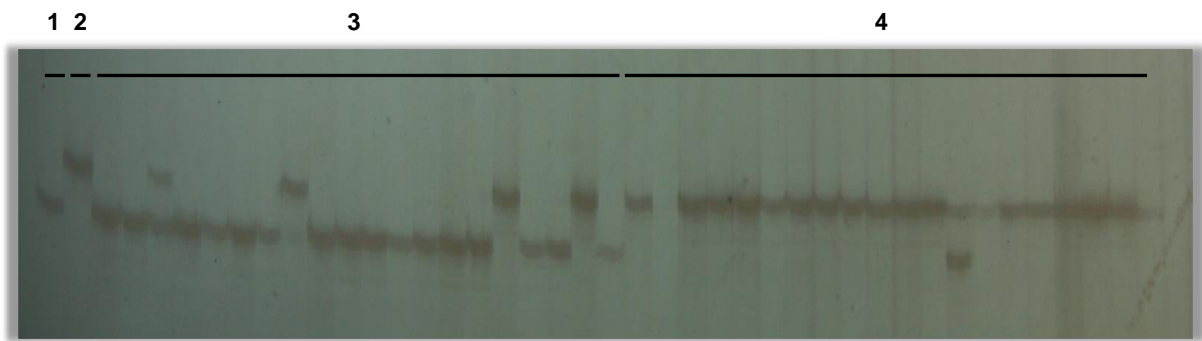


Figura 24. Gel de poliacrilamida (6 %) teñido con nitrato de plata mostrando el MM-SSR Satt252 que resultó polimórfico entre grupos de ADN genómico usando la técnica de análisis de segregantes en grupo. El orden de siembra fue: en primer lugar los dos parentales, (1) FV-L4D y (2) FV-O2B y luego, (3) los 20 individuos que componían el grupo de ADN de alto número promedio de semillas por vaina y (4) los 20 individuos que componían el grupo de ADN de bajo número promedio de semillas por vaina.

DetECCIÓN Y ANÁLISIS DE QTLs

Análisis de un solo marcador o de un solo punto

Con los datos obtenidos del genotipado de los 131 individuos de la población de RILs J14 con los 18 MM-SSR que resultaron polimórficos entre los grupos de ADN genómico, se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrado (χ^2) para verificar que la segregación de dichos MM-SSR se ajustara al modelo de herencia mendeliana característico de una población de RILs en una generación F_6 , para un tipo de MM codominante (segregación esperada 1:1). De los MM-SSR analizados, 17 mostraron una segregación que se ajustaba a la esperada. El MM-SSR Satt252 presentó una leve distorsión en la segregación ($\chi^2_c = 4,01$). A pesar de ello, se lo consideró también en el análisis, dado que el mismo pertenece a un GLM distinto al que se encuentra el gen que regula la forma de hoja.

Como ejemplo de la segregación de los MM-SSR polimórficos observada en la población J14, se muestra la del marcador Sct_010 (Figura 25) que presentó una proporción de 61 A: 62 B, siendo A: el patrón de bandas proveniente del parental de alto NPSV y B: el patrón de bandas proveniente del parental de bajo NPSV. Se analizó si la segregación observada para dicho MM-SSR en la población, ajustaba a la segregación esperada: 62,5 A: 62,5 B. El valor de χ^2_c obtenido fue 0,01 ($P = 0,93$); no detectándose diferencias significativas entre los valores observados y los esperados ($P \leq 0,05$). Por lo tanto, la segregación de dicho MM-SSR se ajustó a la segregación esperada.

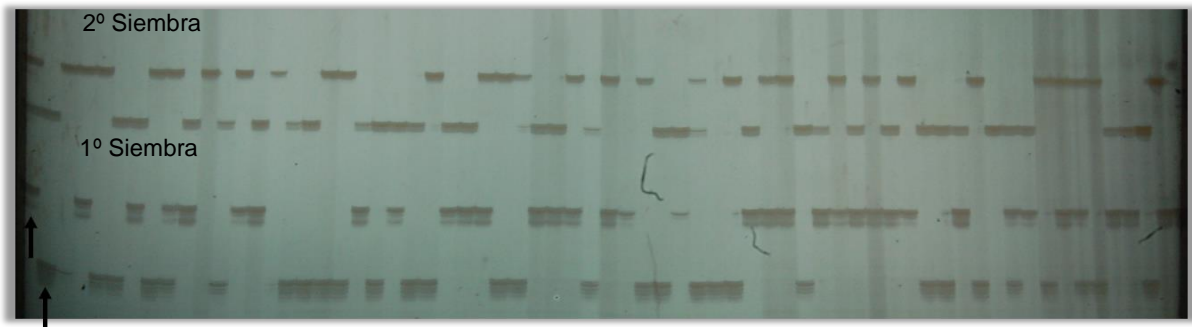


Figura 25. Gel de poliacrilamida (6 %) teñido con nitrato de plata mostrando la segregación del MM-SSR Sct_010 en los individuos F_6 de la población J14. La primera flecha desde la izquierda hacia la derecha, señala el parental de alto número promedio de semillas por vaina: FV-L4D y la segunda flecha representa el parental de bajo número promedio de semillas por vaina: FV-O2B. Luego se sembraron los 131 individuos de la población de RILs J14. El gel fue sembrado en dos etapas, con diferencia de 45 minutos. En la 1º siembra se sembraron 68 individuos y en la 2º siembra 65 individuos.

La asociación entre los MM-SSR que resultaron polimórficos entre los grupos de ADN y el carácter NPSV se determinó, en esta instancia, por el método de un solo punto o un solo marcador. Para ello, se realizó un ANVA a un criterio de clasificación, en el cual los marcadores se utilizaron como fuentes de variación. Los datos fenotípicos que se utilizaron para realizar este primer análisis correspondieron a las medias aritméticas de las tres repeticiones de cada uno de los genotipos evaluados en la primer campaña (2015/16). Para el caso del GLM I, dado que el mismo presentaba un alto número de MM-SSR analizados, para esta primera evaluación se seleccionaron tres marcadores, dos situados en los extremos del grupo de ligamiento, y uno en el medio. En este análisis, cada MM-SSR fue utilizado para dividir la población de mapeo en dos grupos, en función del genotipo del marcador. Luego se compararon la medias fenotípicas para el carácter NPSV de los dos grupos genotípicos obtenidos, con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$) (Figura 26).

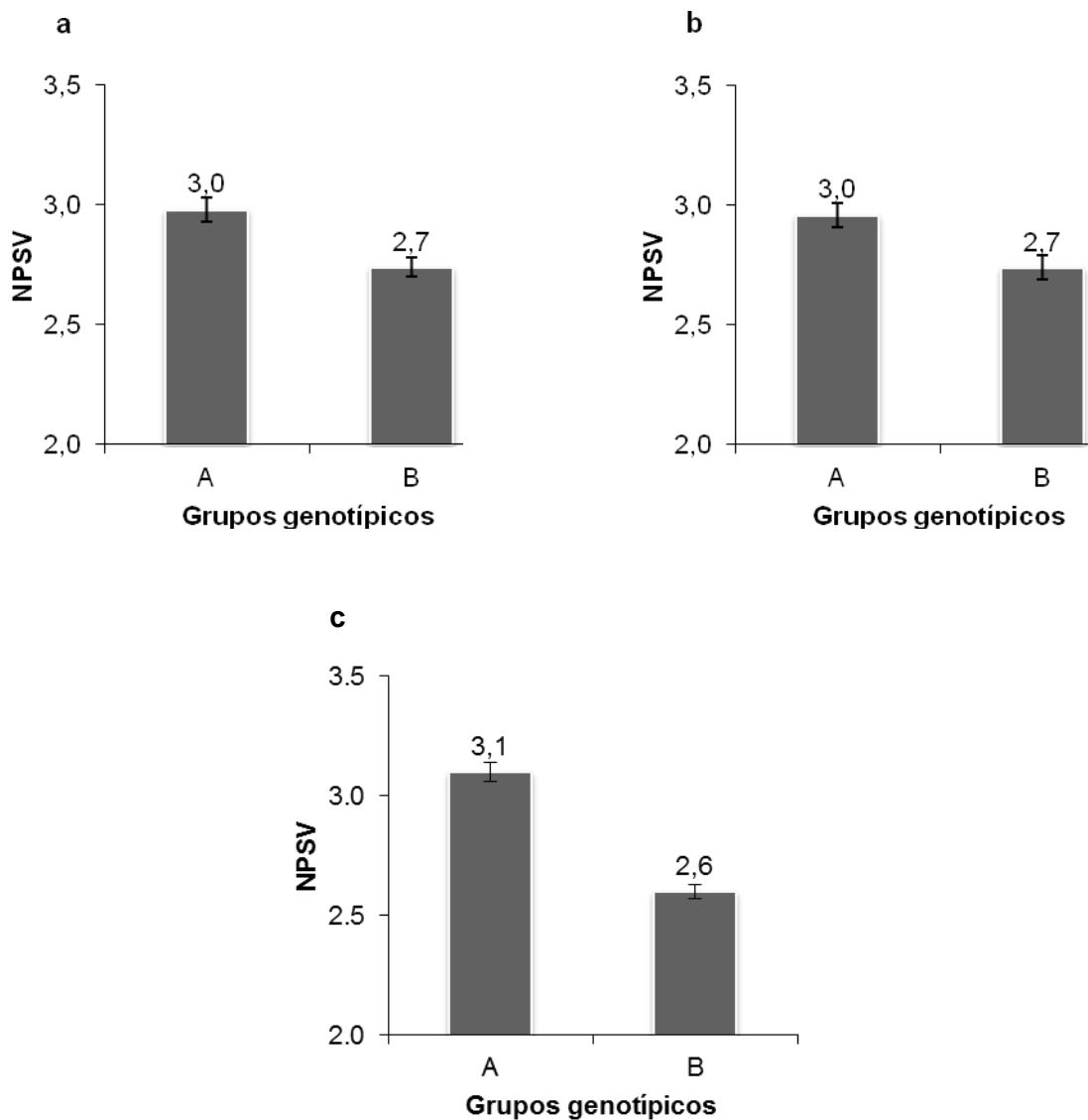


Figura 26. Verificación del ligamiento entre los marcadores: **a.** Satt252, **b.** Sat_113 y **c.** BARCSOYSSR-20-0845 y el carácter fenotípico número promedio de semillas por vaina (NPSV). El marcador Satt252 se encuentra en el grupo de ligamiento molecular (GLM) F, el Sat_113, se encuentra en el GLM L y el BARCSOYSSR-20-0845 se encuentra en el GLM I. El valor que se observa sobre cada una de las barras, corresponde a la media fenotípica del carácter evaluado para cada grupo construido a partir del genotipo del marcador. A: corresponde al alelo proveniente del parental de alto NPSV (FV-L4D) y B: corresponde al alelo proveniente del parental de bajo NPSV. Para los tres marcadores moleculares analizados se detectaron diferencias significativas entre los grupos genotípicos analizados ($P < 0,0001$).

En la Tabla 20 se muestran los resultados del ANVA para los ocho MM-SSR analizados. En la misma figuran los valores del estadístico F, la probabilidad asociada (P), y el parámetro R^2 que expresa el porcentaje de variación fenotípica que explica el QTL que se encontraría ligado a cada marcador.

Tabla 20. Parámetros estadísticos correspondientes al Análisis de la Variancia del carácter número promedio de semillas por vaina. Se detallan los marcadores utilizados como fuentes de variación para dicho análisis correspondiente a los tres grupos de ligamiento molecular en los que se detectó la presencia de algún QTL que controlaría el carácter en estudio.

GLM ⁽¹⁾	Marcador Molecular SSR ⁽²⁾	Valor F	Valor P	R ²
GLM-F	Satt252	37,74	<0,0001	9,4
GLM-F	Sat_234	25,66	<0,0001	7,6
GLM-F	Satt144	11,78	0,0007	3,3
GLM-L	Sat_113	25,66	<0,0001	7,6
GLM-L	Sct_010	23,03	<0,0001	6,3
GLM-I	Satt354	106,24	<0,0001	22,3
GLM-I	Barcsoyssl_20_0845	261,94	<0,0001	41,6
GLM-I	Sat_418	27,7	<0,0001	7,3

⁽¹⁾ GLM: Grupo de Ligamiento Molecular.

⁽²⁾ SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple". Marcadores Microsatélites.

Los marcadores moleculares resaltados en negrita corresponden a los marcadores que presentaron mayor valor de R² para cada GLM.

Para todos los MM-SSR analizados, se detectaron diferencias significativas entre los grupos genotípicos evaluados ($P < 0,001$). Esto indicaría que en las tres regiones analizadas se encontrarían QTLs asociados al carácter NPSV. Esta metodología permitió validar lo que se había observado en el análisis de segregantes en grupo, en el que se habían detectado las mismas tres regiones. El MM-SSR BARCSOYSSR_20_0845, fue el que presentó mayor valor de R² (41,6), indicando que dicho marcador se encontraría ligado a un QTL con efecto mayor. En el GLM F el marcador que presentó mayor valor de R² fue Satt252 (9,4) mientras que en el GLM L fue el marcador el Sat_113 (7,6).

A partir de estos resultados, las tres regiones genómicas que se identificaron asociadas con el carácter NPSV, fueron saturadas con MM-SSR adicionales que se seleccionaron a partir de las bases de datos de Soybase (<http://soybase.org>) y BARCSOYSSR_1.0 (Song et al., 2010; 2016). Para la selección de estos nuevos marcadores se consideraron aquellos MM-SSR que presentaron mayor valor de R² en el análisis de un solo punto. Para el GLM F se cubrió una región aproximada de 6,8 Mb (considerando el mapa físico de la soja) alrededor del MM-SSR Satt252, en el GLM L se cubrió una región de aproximadamente 4,3 Mb alrededor del MM-SSR Sat_113 y en el GLM I, dado que dicho grupo de ligamiento ya se había saturado previamente para caracterizar la región en la cual se encuentra el gen que regula la morfología foliar, se seleccionaron

nuevos MM-SSR con el objetivo de lograr la mayor cobertura posible de esa zona cubriendo una región 10,1 Mb.

Las secuencias de los cebadores seleccionados se obtuvieron de las bases de datos citadas anteriormente y fueron sintetizados por el laboratorio Invitrogen, Buenos Aires, Argentina (<http://www.thermofisher.com>).

Por cada GLM se probaron diez MM-SSR (Tabla 21). Se intentaron seleccionar MM-SSR que hayan sido probados previamente y que hayan amplificado un producto simple, de manera de aumentar las posibilidades de encontrar MM-SSR polimórficos entre los parentales.

Para cada MM-SSR, primero se analizaron los polimorfismos entre los parentales de alto y de bajo NPSV (FV-L4D y FV-O2B, respectivamente). Los MM-SSR que resultaron polimórficos, se utilizaron luego para el genotipado de los 131 individuos de la población de RILs J14. A continuación se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrado (χ^2) para verificar que la segregación de dichos MM-SSR ajustara a segregación esperada (1:1). Aquellos MM-SSR que presentaron una segregación distorsionada se eliminaron del análisis.

Tabla 21. Marcadores moleculares de repeticiones de secuencia simple (SSR) seleccionados para saturar las tres regiones en las que se identificaron QTLs asociados con el carácter número promedio de semillas por vaina.

GLM ⁽¹⁾	Marcadores Moleculares Microsatélites SSR ⁽²⁾
F	Satt030, SSR2892, Sat_262, Satt145, Satt348, Satt423, Satt149, GMES0693, SSR0266, Sat_298.
L	SSR0276, Satt076, Satt448, GMES0630, B17D07, Satt166, Satt678, Satt527, Satt561, GMES1723.
I	Satt239, Satt496, BARCSOYSSR_20_0589, BARCSOYSSR_20_0682, BARCSOYSSR_20_0715, H45B01, BARCSOYSSR_20_0758, BARCSOYSSR_20_0793, CSSR405, BARCSOYSSR_20_0804.

⁽¹⁾ GLM: Grupo de Ligamiento Molecular.

⁽²⁾ SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple". Marcadores microsatélites. En negrita están resaltados los marcadores moleculares SSR que resultaron polimórficos entre las líneas FV-L4D (de alto número promedio de semillas por vaina) y FV-O2B (de bajo número promedio de semillas por vaina), utilizadas como parentales de la población RILs J14, para cada uno de los GLM analizados.

De los 30 pares de cebadores evaluados: 18 (60 %) resultaron polimórficos y 12 (40 %) fueron monomórficos.

Finalmente, la región del GLM F evaluada en este trabajo quedó conformada por ocho MM-SSR, la del L por 11 y el I por 14 MM-SSR. En la Tabla 22 se muestra la

segregación de cada uno de ellos (En Tabla suplementaria 1 del Anexo se muestran las secuencias de los cebadores utilizados).

Tabla 22. Segregación observada de los marcadores moleculares de repeticiones de secuencia simple (SSR) analizados en la población de RILs J14 (n = 131), presentes en los tres grupos de ligamiento molecular en los que se detectaron QTL asociados al carácter número promedio de semillas por vaina.

GLM ⁽¹⁾	Marcador Molecular SSR ⁽²⁾	Valores Observados		Proporción Esperada	χ^2 ⁽⁴⁾	P ⁽⁵⁾
		A ⁽³⁾	B			
F	Satt252	53	76	1:1	4,01	0,04
F	Satt144	62	64	1:1	0,03	0,86
F	Sat_234	57	55	1:1	0,04	0,85
F	Satt334	55	46	1:1	0,80	0,37
F	Satt149	57	73	1:1	1,97	0,16
F	Satt030	60	66	1:1	0,29	0,59
F	Sat_298	53	75	1:1	3,78	0,06
F	Sat_262	62	68	1:1	0,28	0,60
L	Sat_113	61	59	1:1	0,03	0,86
L	Sct_010	61	62	1:1	0,01	0,93
L	Satt284	60	68	1:1	0,50	0,48
L	Satt076	62	66	1:1	0,13	0,72
L	Satt448	64	65	1:1	0,01	0,93
L	Gmes0630	65	66	1:1	0,01	0,93
L	B17D07	62	66	1:1	0,13	0,72
L	Satt166	60	71	1:1	0,92	0,34
L	Satt527	61	67	1:1	0,28	0,60
L	Satt561	65	65	1:1	0,00	1,00
L	GMES1723	63	66	1:1	0,07	0,79
I	Satt354	71	59	1:1	1,11	0,29
I	BARCSOYSSR_20_0845	62	67	1:1	0,19	0,66
I	Sat_418	60	65	1:1	0,20	0,65
I	Sat_268	51	73	1:1	3,90	0,05
I	BARCSOYSSR_20_0842	57	70	1:1	1,33	0,25
I	Ln_at006	56	71	1:1	1,77	0,18
I	Ln_at008	55	61	1:1	0,31	0,58
I	BARCSOYSSR_20_0829	62	65	1:1	0,07	0,79
I	BARCSOYSSR_20_0818	60	65	1:1	0,20	0,65
I	BARCSOYSSR_20_0847	63	65	1:1	0,03	0,86
I	GMES0205	61	68	1:1	0,38	0,54
I	Satt292	61	66	1:1	0,20	0,66
I	Ln_at004	65	63	1:1	0,03	0,86
I	H45201	72	57	1:1	1,74	0,19

Continuación Tabla 22.

⁽¹⁾ GLM: Grupo de Ligamiento Molecular.

⁽²⁾ SSR: "Single Sequence Repeat" o Repeticiones de secuencia simple o Marcadores Microsatélites.

⁽³⁾ A: patrón de banda proveniente del parental de alto número promedio de semillas por vaina (FV-L4D) y B: patrón de banda proveniente del parental de bajo número promedio de semillas por vaina (FV-O2B).

⁽⁴⁾ Valor de Chi-Cuadrado obtenido del análisis de la segregación observada para cada marcador molecular con respecto a la segregación esperada para un marcador codominante en una generación F₆ (1:1) (Para la población analizada, n = 131, los valores esperados son: 65,5:65,5).

⁵ Valor de probabilidad asociada al valor de Chi-Cuadrado obtenido ($P \leq 0,05$).

A partir de los datos obtenidos, con el objetivo de estimar con mayor precisión la posición y el efecto de los QTLs identificados, y aprovechando la mejor cobertura lograda a partir de la incorporación de los nuevos MM-SSR, se aplicó el modelo de análisis de mapeo por intervalos compuestos.

Análisis de mapeo por intervalos compuestos

Previo al análisis de mapeo por intervalos compuestos, se construyó el mapa de ligamiento genético con los MM-SSR presentes en los GLM F, L e I con el programa MapMaker/Exp 3.0.

De los MM-SSR que segregaron en función a lo esperado, dos no se encontraron ligados a ningún GLM (Satt144 y Satt 284) por lo que no fueron considerados en el análisis. El GLM F, quedó dividido en dos grupos, uno conformado por cinco MM-SSR y el otro compuesto solo por dos MM-SSR. De esos dos GLM, uno de ellos presentó una longitud de 30,5 cM y quedó delimitado por los MM-SSR Satt030 y Sat_298; y el otro tuvo una longitud de 8,4 cM quedando delimitado por los MM-SSR Sat_234 y Satt334. El GLM L quedó conformado por nueve MM-SSR y tuvo una longitud de 13,1 cM. Los MM-SSR extremos de este grupo de ligamiento fueron Sct_010 y GMES1723. Finalmente, el GLM I, se compuso de 14 MM-SSR, quedando delimitado por los MM-SSR H45B01 y Satt292. La longitud de éste último grupo de ligamiento fue de 58,2 cM (Figura 27).

Cuando se compararon las longitudes de los fragmentos obtenidos para cada uno de los GLM analizados, con los grupos de ligamiento presentes en el mapa consenso de soja disponible en la base de datos pública de SoyBase (<http://soybase.org>), se observó que para esas mismas regiones las longitudes de los fragmentos fueron similares (Figura 27). Además, se compararon las posiciones de los MM-SSR y las distancias entre los mismos. Para los tres GLM analizados (F, L e I), los MM-SSR mantuvieron el mismo orden comparados con los GLM del mapa consenso. Solo en el GLM L, se detectaron inversiones

en los marcadores Satt561 y Sat_166 comparado con dicho mapa. A pesar de que en general los MM-SSR mantuvieron el mismo posicionamiento, se detectaron diferencias en las distancias obtenidas entre los MM-SSR cuando se compararon los dos mapas de ligamiento genéticos (el obtenido en esta Tesis y el mapa consenso de soja).

En el caso particular del GLM I, que es donde se ubica el gen *Ln*, dado que las 131 RILs habían sido caracterizadas en función de su morfología foliar, se realizó nuevamente el mapeo genético de dicho gen en la población de RILs J14. Esto permitió validar la posición del gen *Ln* así como también los MM-SSR que resultaron ligados al mismo en dos generaciones distintas de una misma población (J14: F₂ y RIL; Figura 27 E y G, respectivamente). Para los dos GLM obtenidos en las dos generaciones analizadas, el gen que regula la forma de hoja se ubicó en posiciones similares (a los 12,4 cM y a los 14 cM del MM-SSR Satt354, en la generación F₂ y en la RIL, respectivamente). Los MM-SSR asociados a dicho gen se mantuvieron en la mismas posiciones salvo para algunos en los que se detectó inversión. En las dos generaciones analizadas, el marcador BARCSOYSSR_20_0842, se encontró consistentemente más próximo al gen que regula la forma de hoja hacia uno de los lados de dicho locus (cercano al MM-SSR Satt292), mientras que hacia el otro lado (cercano al MM-SSR Satt354) hubo una leve modificación, detectándose en la población de RILs, dos nuevos MM-SSR más próximos que fueron BARCSOYSSR_20_0829 y BARCSOYSSR_20_0845 (Figura 27 E y G).

Mediante el uso combinado del mapa genético generado para la población de RILs J14 y los datos fenotípicos obtenidos de las dos campañas analizadas (2015/16 y 2016/17), se realizó el análisis de QTLs. Para ello se utilizaron 2 metodologías distintas en simultáneo, según se detalló en la Sección de Materiales y Métodos: mapeo por intervalos compuestos y mapeo multicarácter por intervalos compuestos.

Tanto para el análisis de mapeo por intervalos compuestos como así también para el mapeo multicarácter por intervalos compuestos, en primer lugar se calcularon los valores críticos para la detección de los QTLs a través del test de permutación (1000 permutaciones). Para el mapeo por intervalos compuestos, en la campaña 2015/16 el valor de LOD crítico fue de 2,0 y para la campaña 2016/17 fue de 1,9. Para el mapeo multicarácter por intervalos compuestos el umbral se fijó en 2,7. Solo en los casos en los que el valor de LOD calculado fuera superior al valor de LOD crítico estimado, se consideró la presencia de un QTL.

El análisis de QTLs utilizando el método de mapeo por intervalos compuestos permitió identificar cuatro QTLs asociados al NPSV. Dos se encontraron en el GLM F y de los otros dos, uno se detectó en el GLM L y el otro en el I. Los cuatro QTLs identificados no

solo se mapearon consistentemente en la misma posición en los dos años evaluados, sino que además mantuvieron efectos similares (Tabla 23, Figura 27). Por lo tanto, dichos QTLs podrían ser considerados QTLs estables. En el caso del GLM F, los dos QTLs identificados explicaron: uno entre 8-12 % (*qnpsv-1*) y el otro el 10 % (*qnpsv-2*) de la variación fenotípica observada. En el GLM L el QTL detectado (*qnpsv-3*) explicó entre el 12-17 % de dicha variación. Finalmente, en el GLM I se encontró un QTL (*qnpsv-4*) que explicó el mayor porcentaje de la variación fenotípica (entre el 40-44 %) y que además presentó el mayor valor de LOD (25,5 en promedio para los dos años). En conjunto, los cuatro QTLs detectados lograron explicar en promedio un 75,3 % de la variación fenotípica observada.

Para el carácter evaluado, valores positivos en los efectos aditivos, indicaron el efecto de sustitución de un alelo del parental de bajo NPSV (FV-O2B), por un alelo del parental de alto NPSV (FV-L4D) (Tabla 23). Con lo cual, para los cuatro QTLs identificados, los alelos del parental FV-L4D incrementaron el valor fenotípico del NPSV.

El mapeo multicarácter por intervalos compuestos no solo permitió validar los cuatro QTLs que habían sido identificados previamente por el mapeo por intervalos compuestos, sino que además permitió determinar la posición más probable de dichos QTLs. Las posiciones se obtuvieron considerando los mayores valores de LOD observados para cada región analizada. En el GLM F, los mayores valores de LOD se detectaron a los 27,1 cM (en uno de los fragmentos obtenidos) y a los 5,5 cM (en el otro fragmento), cercanos a los MM-SSR Sat_298 y Satt334, respectivamente. En el GLM L, el valor de LOD más alto se encontró a los 12,8 cM cercano al MM-SSR GMES1723. En el GLM I, el mayor valor de LOD se identificó a los 28,3 cM cercano al MM-SSR GMES0205 (Tabla 23) (Anexo, Figura suplementaria 4).

El QTL detectado en el GLM I se mapeo cercano al gen que regula la morfología foliar (*Ln*). Teniendo en cuenta el intervalo de confianza obtenido para dicho QTL que fue de 27,4-32,5 cM y la posición del gen *Ln* a los 24,4 cM, se determinó que ambos *loci* están ubicados a una distancia de 3 cM (Figura 27 G).

Tabla 23. Posición y efectos de los QTL (del inglés Quantitative Trait Loci), asociados con el carácter número promedio de semillas por vaina detectados en la población de RILs J14 (n = 131) (FV-L4D x FV-O2B) en las estaciones de crecimiento 2016 y 2017, utilizando los métodos de mapeo por intervalos compuestos y mapeo multicarácter por intervalos compuestos.

QTL ^(a)	GLM/CR ^(b)	Año	Posición (cM) ^(c)	Marcadores Flanqueantes ^(d)	LOD ^(e)	R ² ^(f)	a ^(g)
<i>Mapeo por intervalos compuestos</i>							
qnpsv-1	F/13	2016	26,1	Satt149- Sat_298	3,7	12,0	0,14
		2017	26,1	Satt149- Sat_298	2,6	8,0	0,12
qnpsv-2	F/13	2016	5,0	Sat_234- Satt334	2,6	9,7	0,12
		2017	4,5	Sat_234- Satt334	2,7	9,8	0,13
qnpsv-3	L/19	2016	12,8	Satt166- GMES1723	3,7	10,1	0,12
		2017	12,8	Satt166- GMES1723	6,3	17,4	0,17
qnpsv-4	I/20	2016	28,3	GMES0205 -Sat_418	26,7	43,9	0,25
		2017	25,3	BARCSOYSSR_20_0842 -Sat_268	24,4	39,7	0,25
<i>Mapeo multicarácter por intervalos compuestos</i>							
qnpsv-1	F/13	2016/17	27,1	Satt149- Sat_298	9,2		
qnpsv-2	F/13	2016/17	5,5	Sat_234- Satt334	5,1		
qnpsv-3	L/19	2016/17	12,8	Satt166- GMES1723	12,8		
qnpsv-4	I/20	2016/17	28,3	GMES0205 -Sat_418	17,3		

^(a) QTL (quantitative trait loci). QTL identificados asociados al número promedio de semillas por vaina (NPSV).

^(b) GLM grupo de ligamiento molecular. CR: cromosoma donde se detectaron los QTL.

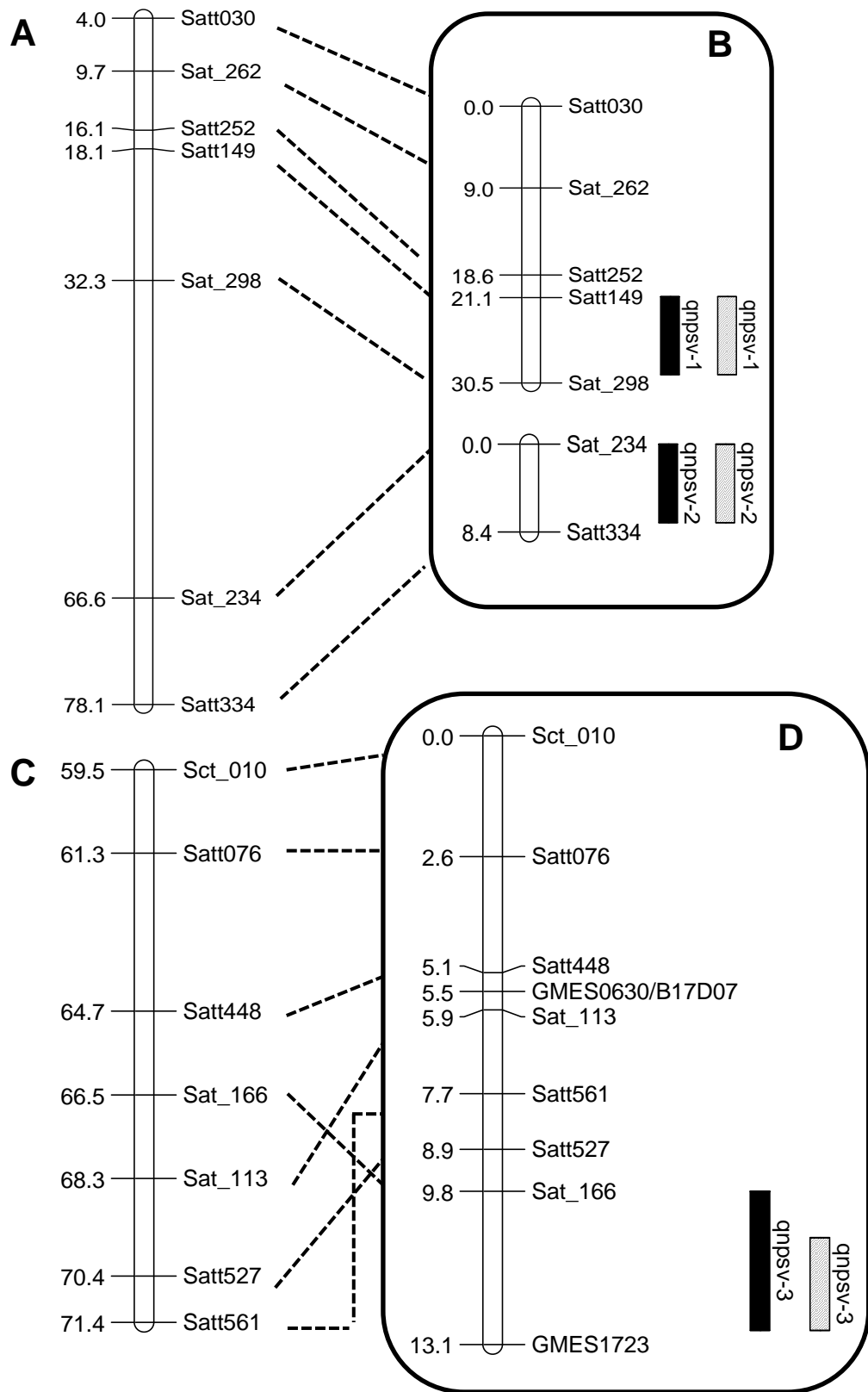
^(c) Posición donde se registró la mayor probabilidad (LOD) de encontrar un QTL.

^(d) Marcadores moleculares que flanquean la posición más probable de hallar un QTL. En negrita se identifican los marcadores más cercanos al mayor valor de LOD observado.

^(e) LOD indicativo de la verosimilitud del ligamiento y significa el log₁₀ "odds". El valor de LOD mínimo para declarar la existencia de un QTL, se estableció por la realización de 1000 permutaciones (α = 0,05). Para el mapeo por intervalos compuestos, en el año 2016 el valor mínimo fue de 2,0 y en el año 2017 fue de 1,9. Para el mapeo multicarácter por intervalos compuestos el umbral se fijó en 2,7.

^(f) Porcentaje de variación fenotípica explicada por el QTL.

^(g) Se muestra el efecto aditivo del alelo proveniente del parental FV-L4D. Valores positivos indican que los alelos de dicho parental incrementan el valor fenotípico del carácter NPSV.



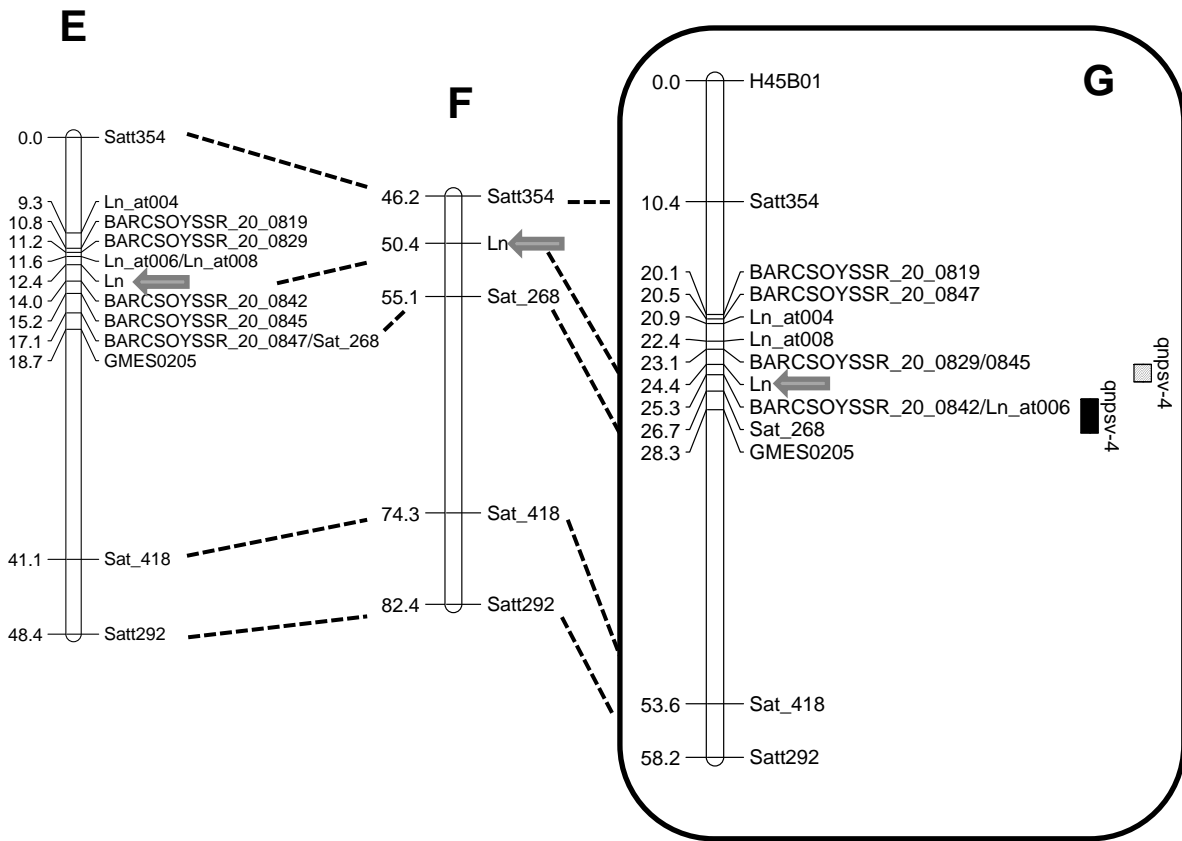


Figura 27. Localización de QTLs asociados con el carácter número promedio de semillas por vaina (NPSV) obtenidos a través del mapeo por intervalos compuestos. Las barras ubicadas hacia la derecha representan los intervalos de confianza para cada uno de los QTLs detectados. Las barras sólidas corresponden a los QTL detectados en el año 2016 y las barras con líneas diagonales corresponden a los detectados en el año 2017.

A, C y F Grupos de ligamiento molecular F, L e I obtenidos del mapa consenso de soja presente en la base de datos de SoyBase. **B, D y G** son los grupos de ligamiento F, L e I obtenidos a partir del genotipado de la población de RILs J14 de 131 individuos obtenida del cruzamiento entre FV-L4D (de forma de hoja lanceolada y alto NPSV) y FV-O2B (de forma de hoja oblonga y bajo NPSV). Para la construcción del mapa genético se utilizó el programa MapMaker/Exp 3.0 y las distancias genéticas (cM) fueron calculadas usando la función de Kosambi. Las líneas punteadas unen marcadores SSR en común entre los dos mapas comparados. Las distancias están dadas en centimorgan (cM) hacia el lado izquierdo de ambos mapas y la posición de los QTLs se muestran hacia la derecha. **E** grupo de ligamiento obtenido a partir del genotipado de la población F₂ J14 de 130 individuos, utilizada en la sección anterior para el mapeo genético del gen que regula la forma de hoja (*Ln*). Las flechas indican la ubicación del gen *Ln*.

Para determinar la existencia de interacciones epistáticas entre los distintos QTLs detectados en las diferentes regiones, se realizó un ANVA a dos criterios de clasificación. Como fuentes de variación se utilizaron los MM-SSR que se ubicaron más cercanos a los mayores valores de LOD informados en el mapeo multicarácter por intervalos compuestos. Los MM-SSR utilizados en el análisis fueron: Sat_298 y Satt334, provenientes de los dos fragmentos obtenidos del GLM F; GMES1723 del GLM L y GMES0205 del GLM I.

Ninguna de las interacciones evaluadas entre los distintos pares de MM-SSR resultó significativa ($P > 0,05$).

A modo de ejemplo en la Tabla 24 se muestra el resultado de uno de los análisis realizados, en el que se consideraron los MM-SSR GMES1723 (GLM L) y GMES0205 (GLM I). En la misma se puede observar, que si bien se detectaron efectos significativos para cada MM-SSR evaluado individualmente, la interacción entre ambos marcadores resultó no significativa ($P = 0,12$).

Tabla 24. Análisis de la variancia a dos criterios de clasificación para la variable número promedio de semillas por vaina utilizando los marcadores moleculares microsatélites GMES1723 (perteneciente al grupo de ligamiento molecular F) y GMES0205 (situado en el grupo de ligamiento molecular I).

Fuente de Variación	gl ¹	Valor de F ²	Valor de P ³
GMES1723	1	29,87	< 0,0001
GMES0205	1	82,98	<0,0001
GMES1723*GMES0205	1	2,49	0,1181

¹ gl grados de libertad.

² Valor estadístico del test.

³ Valor de probabilidad asociada al estadístico obtenido.

Asociación entre los caracteres forma de hoja y número promedio de semillas por vaina

Además de los análisis genéticos y la caracterización molecular del carácter NPSV, en esta sección se analizó como se asocian los caracteres forma de hoja y NPSV en un fondo genético donde se expresan altos porcentajes de vainas de cuatro semillas (60 %; NPSV = 3,6).

Considerando los datos de la morfología foliar tanto de la población F₂ J3 como así también de la población de RILs J14, se construyeron los histogramas de frecuencias del

NPSV, diferenciando a los individuos en lanceolados, heterocigotas y oblongos para el caso de la población F_2 y en lanceolados y oblongos para la población de RILs (Figura 28).

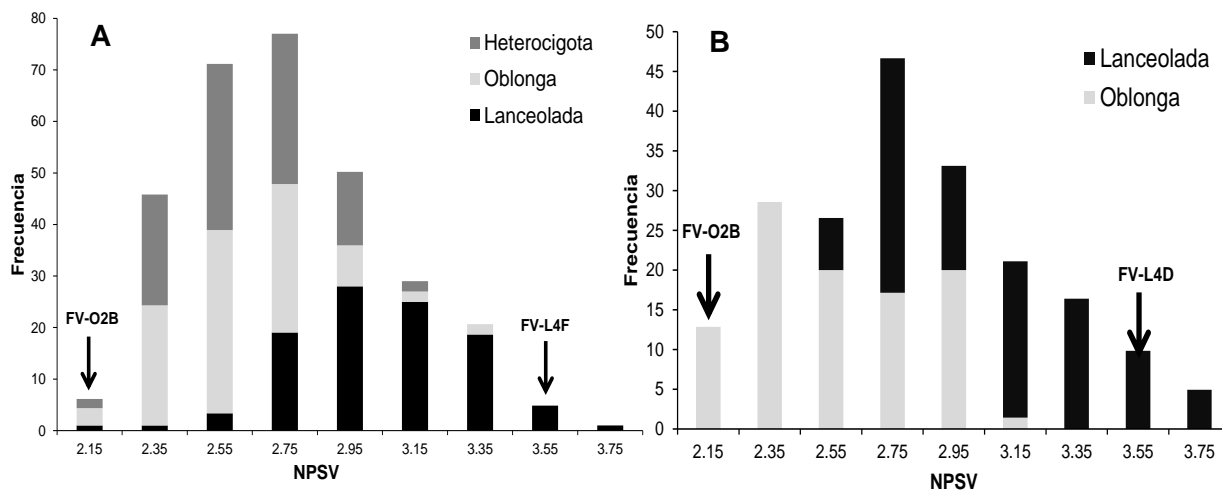


Figura 28. Histograma de frecuencias para el carácter número promedio de semillas por vaina (NPSV), discriminando a los individuos por su morfología foliar. **A.** Población F_2 J3 (1050 individuos) derivada del cruzamiento entre FV-L4F y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente. **B.** Población RILs J14 (131 individuos) derivada del cruzamiento entre FV-L4D y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente.

A partir del análisis de la distribución de frecuencias de la población F_2 J3, se pudo observar que la subpoblación de genotipos lanceolados presentó un rango de variación para el NPSV de 2,15 (con 0 % de vainas de cuatro semillas) a 3,75 (con 75% de vainas de cuatro semillas). A su vez, los genotipos oblongos presentaron un rango de variación de 2,15 (con 0 % de vainas de cuatro semillas) a 3,35 (con 35 % de vainas de cuatro semillas). Y para los individuos heterocigotas el rango de NPSV fue 2,15 (con 0 % de vainas de cuatro semillas) a 3,15 (con 15 % de vainas de cuatro semillas). Por otra parte, en la RIL J14 se observó un comportamiento similar al de la población F_2 . En la subpoblación de genotipos lanceolados se pudo apreciar que los mismos presentaron un rango de variación para el NPSV de 2,55 (con 0 % o 1 % de vainas de cuatro semillas) a 3,75 (con 75 % de vainas de cuatro semillas), mientras que para los oblongos fue 2,15 (con 0 % de vainas de cuatro semillas) a 3,15 (con 15 % de vainas de cuatro semillas).

II.2.5. DISCUSIÓN

En soja al igual que en los demás cultivos de granos, incrementos en el rendimiento pueden lograrse tanto a través de la mejora en el NSS como así también en el PUS. Resultados recientes indicaron que el aumento del rendimiento en soja en los últimos 35 años, ha estado asociado fundamentalmente con el aumento en el NSS (De Felipe et al., 2016). El NSS depende a su vez, del NVS y del NPSV.

Resultados de esta Tesis mostraron los efectos de incrementar el NPSV (logrado a través del aumento en el porcentaje de vainas de cuatro semillas) sobre el NSS y su contribución al rendimiento (Capítulo I, Resultados, Tabla 7, Figura 10), sugiriendo que la mejora de este carácter podría generar un impacto positivo en la productividad del cultivo. Dado que actualmente las variedades comerciales presentes en el mercado Argentino tienen en promedio valores de NPSV inferiores a 3 (debido a la presencia en su mayoría de vainas de dos y de tres semillas) (Capítulo I, Introducción, Figura 2), una forma de aumentar el NPSV de dichas variedades sería a través del incremento en el porcentaje de vainas de cuatro semillas de las mismas.

Para poder manipular y mejorar el NPSV es necesario comprender las bases genéticas que lo determinan. Es por ello, que una estrategia para poder detectar aquellos genes cuyas variantes alélicas son responsables de una parte de la variabilidad fenotípica observada, se basa en la utilización de MM. Los mismos son empleados en la construcción de los mapas de ligamiento genético y junto con los datos fenotípicos del carácter permiten identificar las regiones (QTLs) que están involucradas en la determinación del mismo.

Para la búsqueda de los MM-SSR ligados al carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas, caracterizado a través del NPSV, durante el desarrollo de esta Tesis se obtuvieron tres poblaciones de RILs a partir del cruzamiento entre parentales que difirieron significativamente en dicho carácter (Tabla 16). De las tres poblaciones, se seleccionó la población J14 para realizar el mapeo genético del NPSV. Las otras dos poblaciones fueron obtenidas con el objeto de poder validar en el futuro, en otros fondos genéticos, los QTLs encontrados en la población J14. La importancia de validar los QTLs detectados en distintos ambientes y fondos genéticos, radica en que permite detectar QTLs estables que son los que finalmente se van a poder incorporar en un programa de mejoramiento asistido por MM (Paterson et al., 1991; Song et al., 2004).

Además de la caracterización de los parentales se realizó un análisis de las F_1 . El hecho de que en dicha generación se haya observado una dominancia parcial de los menores valores no influiría sobre la obtención de nuevos cultivares de soja, dado que

dichos efectos se expresan únicamente en individuos heterocigotas; y como es sabido, en soja se comercializan líneas estabilizadas (i.e. homocigotas).

A partir de la evaluación fenotípica del carácter NPSV en la población de RILs J14 y en las poblaciones segregantes F_2 J3 y J81 se corroboró que el mismo presenta una distribución normal y continua, típica de caracteres de herencia poligénica (Figura 21). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Domingo (1945) y Chen (1998) para otras poblaciones, quienes sugirieron que el NPSV estaría regulado por la combinación de unos pocos genes mayores y varios genes menores. Además, se obtuvo un elevado valor de H^2 para dicho carácter (0,98), indicando que la mayor proporción de la variación fenotípica observada para el carácter NPSV se debió a la variancia genética y dentro de esta, fundamentalmente a la variancia aditiva. Esto se debe a que por lo general la variabilidad observada entre RILs estabilizadas suele deberse a la variación de genes aditivos ya que los componentes de la variancia genética debida a la dominancia se van perdiendo a lo largo de los sucesivos ciclos de autofecundación (Semagn et al., 2010). Además, el elevado valor de H^2 es un indicador de que este carácter tiene una fuerte regulación genética y escasa influencia ambiental. Por otra parte, valores elevados de H^2 para el NPSV fueron también observados por otros autores (Guiday et al., 2017; Karasu et al., 2009; Manav y Arora 2017), lo que indicaría una alta respuesta a la selección para dicho carácter (Guiday et al., 2017).

Para acelerar el proceso de detección de QTLs asociados con el NPSV se utilizó la metodología de análisis de segregantes en grupo. Si bien esta técnica ha sido utilizada ampliamente en la identificación de MM relacionados con caracteres cualitativos, como podrían ser los genes de resistencia a enfermedades o a insectos (Bales et al., 2013; Chiesa et al., 2017; Michelmoore et al., 1991), en los últimos años se la ha comenzado a utilizar con éxito para identificar MM ligados a caracteres relacionados con rendimiento y tolerancia a sequía, que son características que presentan una base genética cuantitativa (Quarrie et al., 1999; Shashidhar et al., 2005; Venuprasad et al., 2009; Yuan et al., 2002). La aplicación de esta técnica permitió detectar tres regiones correspondientes a tres GLM diferentes (F, L e I) que se relacionaron con el carácter NPSV. Estos resultados claramente demuestran la efectividad que presenta esta metodología para identificar principalmente QTLs con efectos mayores, que son los que realmente presentan utilidad para el mejoramiento asistido por MM (Venuprasad et al., 2009). Por otra parte, focalizar el análisis solamente en esas tres regiones, permitió reducir considerablemente el tiempo y los costos en el mapeo de QTLs asociados al NPSV.

Dado que en un principio se disponía de pocos MM-SSR para realizar el mapeo genético y el posterior análisis de QTLs, se condujo un análisis de un solo punto o un solo marcador para establecer el grado de asociación entre los MM-SSR y los QTLs identificados. Para las tres regiones evaluadas, los MM-SSR que habían resultado polimórficos en el análisis de segregantes en grupo, presentaron una asociación significativa con el carácter bajo estudio (Tabla 20), validando así los resultados obtenidos en dicho análisis. Uno de los inconvenientes que presenta esta metodología es que al considerar un único marcador a la vez, los efectos de los QTLs están influenciados por la distancia entre el marcador y el QTL, por lo que puede ocurrir que dichos efectos sean subestimados por recombinación entre ambos (Tanksley, 1993). Por lo tanto, para reducir estos inconvenientes, las tres regiones identificadas inicialmente fueron saturadas con nuevos MM-SSR y a partir de la aplicación del análisis de mapeo por intervalos compuestos se buscó precisar con mayor exactitud la posición y los efectos de los QTLs detectados.

Como primer paso para el mapeo por intervalos compuestos, se construyeron los tres GLM en los que se habían detectado QTLs asociados al NPSV. Dichos grupos fueron comparados con los GLM del mapa consenso de soja presente en la base de datos de Soybase (Figura 27). Las posiciones y el orden de cada uno de los MM-SSR dentro de cada GLM obtenido en este estudio fue coherente con lo informado en el mapa consenso de soja (excepto para el GLM L en el que se detectó inversión en los MM-SSR Satt561 y Sat_166). El alto grado de similitud en el posicionamiento y el orden de los MM-SSR en ambos mapas confirman la validez del análisis genético realizado en esta Sección.

Si bien la posición y el orden de los MM-SSR fueron consistentes en los dos mapas genéticos comparados, se observaron diferencias en las distancias genéticas entre ellos. Estas variaciones detectadas en el orden de algunos marcadores y en las distancias genéticas, son esperables si se tiene en cuenta que para el mapeo genético se utilizaron poblaciones diferentes. En esta Tesis la población derivó de un cruzamiento biparental de dos líneas experimentales desarrolladas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal (FV-L4D y FV-O2B). En cambio, el mapa de ligamiento consenso que está presente en la base de datos de Soybase, basado en el mapa de Song et al. (2004), se obtuvo a partir del mapeo de cinco poblaciones derivadas de los cruzamientos: Minsoy x Noir 1, Minsoy x Archer, Archer x Noir 1, Clark x Harosoy y A81-356022 x PI468916. Estas modificaciones en el orden y en las distancias genéticas han sido previamente informadas por otros autores (Chiesa et al., 2017; Hwang et al., 2009).

Una de las regiones en las que detectó la presencia de un QTL coincidió con la zona donde se encuentra el gen que regula la forma de los folíolos (*Ln*). Como se conocía la

morfología foliar de los 131 individuos de la población de RILs, se realizó nuevamente el mapeo genético de dicho carácter. Este análisis permitió validar los resultados obtenidos en la Sección anterior de este Capítulo (Figura 27), en la cual el mapeo genético se había realizado sobre la misma población pero en una generación más temprana (F_2). Los 13 MM-SSR que resultaron ligados al gen *Ln* en la generación F_2 se mantuvieron en la RIL, determinando la existencia real de ligamiento entre dichos MM-SSR y el gen. Esto último está relacionado con que en las poblaciones F_2 solo se presenta un único evento de recombinación con lo cual, puede ocurrir que si los MM no están lo suficientemente ligados al gen, en los sucesivos ciclos de autofecundación hasta llegar a la obtención de las RILs, dichos marcadores pueden llegar a perderse por recombinación (Vinod, 2006). Por otra parte, si bien se detectaron algunas inversiones en general los MM-SSR mantuvieron el mismo orden y las mismas distancias en relación al gen *Ln* en los dos grupos de ligamiento analizados.

El mapeo por intervalos compuestos permitió detectar cuatro QTLs relacionados con el carácter NPSV. Dos se encontraron en el GLM F (*qnpsv-1* y *qnpsv-2*), uno se detectó en el GLM L (*qnpsv-3*) y el otro en el I (*qnpsv-4*) (Figura 27, Tabla 23). Los mismos cuatro QTLs fueron identificados en la misma posición a través del mapeo multicarácter por intervalos compuestos. El haber detectado los mismos QTLs en dos años diferentes, con condiciones ambientales contrastantes, demuestra la estabilidad de los QTLs identificados. Por otra parte, cada uno de los QTLs encontrados explicaron un 10 % o más de la variabilidad fenotípica observada para el carácter NPSV, por lo que se tratarían de QTLs mayores (Collard et al., 2005). Estos resultados eran esperables, dado que la metodología que se utilizó inicialmente para identificar las regiones que estarían asociadas a dicho carácter (Análisis de Segregantes en Grupo), por lo general solo permite detectar QTLs con efectos mayores (Vikram et al., 2012). Lo más interesante de estos cuatro QTLs detectados, es que en conjunto lograron explicar más del 70 % de la variabilidad fenotípica observada para el carácter NPSV.

A su vez, los cuatro QTLs detectados (*qnpsv-1*, *qnpsv-2*, *qnpsv-3*, *qnpsv-4*) presentaron efectos aditivos significativos de signo positivo, indicando que todos ellos aumentan el NPSV. En todos los casos, los alelos provenientes de la línea parental FV-L4D fueron los que incrementaron el NPSV. Además, no se detectaron interacciones epistáticas entre ninguno de los QTLs identificados, sugiriendo la existencia de solo aditividad entre los distintos *loci* caracterizados.

Hasta el momento en pocos trabajos se han reportado QTLs asociados a la característica NPSV. Por otra parte, en la mayoría de ellos no se han podido validar dichos

QTLs ya que los mismos han presentado interacción con los distintos ambientes y fondos genéticos evaluados.

Una de las regiones en las que se detectó un QTL corresponde al GLM L (Cromosoma 19) de la soja. Liu et al. (2011) y Kim et al. (2013) también detectaron en ese mismo GLM un QTL. A pesar de la coincidencia en el GLM se encontraron discrepancias con lo informado por los autores. En primer lugar, el QTL detectado por Liu et al. (2011) se encontraba ligado al MM-SSR Satt388 y el de Kim et al. (2013) estaba ligado al MM-SSR Satt238. Si bien ninguno de estos MM fueron utilizados en el mapeo genético realizado en esta Tesis, los mismos se encuentran posicionados a los 4.212.645 de pb y a los 2.862.286 pb del inicio del cromosoma (19; GLM F), respectivamente, en el mapa físico de soja. Mientras que en esta Tesis el MM-SSR que se detectó más cercano al QTL localizado en el GLM L (GMES1723) está posicionado a los 44.938.026 de pb. Con cual, la distancia física entre el QTL posicionado en este trabajo y los presentados con anterioridad (más de 40,73 Mb) es muy alta para que pueda ser considerado el mismo QTL. Por otro lado, la metodología utilizada en los dos trabajos antes mencionados (análisis de un solo punto) determina una menor precisión en el posicionamiento de los QTLs, sumado a que en los dos estudios no solo no se pudieron validar los QTLs sino que además no se calcularon ni los efectos aditivos ni tampoco interacciones epistáticas.

Por su parte, Yang et al. (2013), si bien identificaron seis QTLs asociados al número de vainas de cuatro semillas, solo uno de ellos presente en el GLM A1 mostró efectos principales estables. En la población caracterizada en esta Tesis el análisis de segregantes en grupo no permitió detectar QTLs en el GLM A1, lo que no significa que no pueda existir un QTL en esa región. Para corroborar la presencia de un QTL en dicho GLM asociado al NPSV, sería necesario realizar un mapeo genético de la región con aquellos marcadores pertenecientes al GLM mencionado que inicialmente resultaron polimórficos entre los parentales utilizados para la obtención de la población de RILs J14 (Tabla 19).

Por último, Jeong et al. (2011), utilizaron los mismos MM-SSR que habían sido empleados en el mapeo genético del gen *Ln*, para determinar si había asociación entre dichos marcadores y el carácter NPSV. Para la región evaluada (GLM I), se detectó un MM-SSR que explicó el 55 % de la variación fenotípica del carácter. Valores elevados de R^2 (40-44 %) también fueron observados en esta Tesis en ese mismo GLM (I). El inconveniente que muestran los resultados presentados por Jeong et al. (2011) es que, por un lado, se utilizó un análisis de un solo punto, que como se mencionara anteriormente es el método menos potente para detectar QTLs. Por otra parte, al igual que en los trabajos de Liu et al.

(2011) y Kim et al. (2013), los resultados no fueron validados ya que correspondieron a una sola población (R_3F_2) caracterizada en un solo ambiente.

Considerando la información presente hasta momento, uno de los resultados más novedosos de esta parte de la Tesis, fue que se pudieron identificar cuatro QTLs asociados al NPSV a través de cuatro metodologías distintas (“Análisis de Segregantes en grupo”; “Análisis de un solo punto”; “Mapeo por intervalos compuestos” y “Mapeo multicarácter por intervalos compuestos”), que no solo se mantuvieron estables en los dos ambientes evaluados, sino que además, se detectaron en la misma posición y con efectos aditivos similares en los dos años caracterizados. Por otra parte, lo más destacable de los QTLs detectados, es que los que se encuentran presentes en los GLM F y L corresponden a nuevas regiones no citadas previamente en la literatura como asociadas al carácter en estudio.

A su vez, la detección de dichos QTLs permitió conocer el origen de una proporción de la variabilidad fenotípica total observada para el NPSV en las poblaciones utilizadas en este estudio. Determinar aquellas zonas que son responsables de la variabilidad del NPSV y posicionarlas en los grupos de ligamiento conocidos del mapa genético de soja representa el punto de partida para estudiar las bases genéticas que regulan la expresión de este carácter.

Por otra parte, un aspecto interesante para destacar de estos resultados, es el contexto genético en que los QTLs fueron identificados. Hasta el momento los parentales que se han utilizado en el mapeo de QTLs asociados al NPSV presentaron valores bajos para este carácter que han variado de 1,7 a 2,8 (Jeong et al., 2011; Kim et al. 2013; Liu et al., 2011; Yang et al., 2013). Por el contrario, los parentales utilizados en esta Tesis para la obtención de las poblaciones no solo presentaban buen comportamiento agronómico sino que además tenían un alto porcentaje de vainas de cuatro semillas y de NPSV ($\geq 60\%$ y $\geq 3,6$, respectivamente). La utilización de estos parentales no solo permitió generar poblaciones con suficiente variabilidad para detectar QTLs, sino que además, en el caso de la población J14, permitió identificar los alelos que incrementan el NPSV, los cuales en caso de mantenerse estables en otros fondos genéticos podrán ser utilizados en la mejora del NPSV de las variedades actuales.

La ventaja principal de contar con MM-SSR ligados a las variantes alélicas que aumentan el NPSV, es que los mismos permitirán acelerar el proceso de introgresión de la característica alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a los cultivares comerciales. Si bien este carácter podría ser mejorado a través de la selección fenotípica del mismo, dado a que presenta alta heredabilidad (Tabla 18) y posiblemente alta respuesta a la selección. Uno

de los inconvenientes que tiene es que la selección debe hacerse llegando a madurez, con lo cual prolonga los tiempos de obtención de nuevas variedades. Por otra parte, al ser un carácter cuantitativo, se requiere del manejo de poblaciones de gran tamaño para poder identificar aquellos individuos que hayan acumulado los distintos alelos que mejoran la característica. A esto se debe agregar el tiempo que requiere realizar el fenotipado de cada una de las plantas. Por lo tanto, es justamente en estos caracteres complejos donde la SAM presenta las mayores ventajas (Collard y Mackill, 2008), permitiendo reducir el costo y el tiempo de mejora del carácter bajo estudio.

En esta sección además de presentarse los análisis genéticos y moleculares del carácter NPSV, se mostró como se asocia el mismo con la forma de hoja en un fondo genético donde se expresan altos porcentajes de vainas de cuatro semillas ($\geq 60\%$) y por consiguiente altos NPSV ($\geq 3,6$) (Figura 28).

La distribución de frecuencias del carácter NPSV en la población F_2 J3 caracterizando a los individuos en oblongos, heterocigotas y lanceolados, permitió corroborar lo que se había observado inicialmente antes de comenzar con este estudio, de que genotipos con folíolos lanceolados pueden presentar tanto bajos como altos NPSV (rango: 2,15 a 3,75; 0 % a 75 % de vainas de cuatro semillas) (Figura 29 A). Este mismo comportamiento también fue observado en la RIL J14. Los resultados presentados en esta Sección discrepan de los obtenidos por Jeong et al. (2011) (Figura 29 B), quienes habían sugerido que la hoja lanceolada y el alto NPSV segregaban siempre juntos.

Por otra parte, el rango explorado para el NPSV en los individuos lanceolados caracterizados en esta Tesis (2,15 a 3,75) fue mucho mayor al rango obtenido por Jeong et al. (2011) (2,55 a 2,95). Además, en la población J3 (Figura 29 A), se observó que para los distintos valores de NPSV caracterizados, hubo una mayor superposición de individuos lanceolados y oblongos. En cambio, en el trabajo de Jeong et al. (2011), claramente se puede distinguir que los genotipos lanceolados se correspondieron con los mayores valores de NPSV, mientras que los oblongos con los menores valores, no detectándose prácticamente superposición entre ambas morfologías foliares para los distintos valores de NPSV evaluados (Figura 29 B).

Las diferencias en los rangos explorados para el NPSV y en el grado de superposición entre los genotipos lanceolados y oblongos en relación a dicho carácter obtenidos en el trabajo de Jeong et al. (2011) en comparación con las poblaciones evaluadas en esta Tesis (J3, J14), se debería a las características de las poblaciones analizadas en cada estudio. Jeong et al. (2011) evaluaron una población RC_3F_2 de 309 individuos derivada del cruzamiento entre dos parentales que presentaban un NPSV de 2,7

(lanceolado) y 2,0 (oblongo). En cambio, la población F₂ J3 analizada en esta Tesis, corresponde a una F₂ de 1050 individuos, obtenida de parentales que presentaban un NPSV de 3,5 (lanceolado) y 2,2 (oblongo).

Los resultados presentados claramente demuestran que, a diferencia de lo planteado por Jeong et al. (2011), los genotipos lanceolados no siempre segregan con los mayores valores de NPSV. Por lo tanto, el grado de asociación que se establece entre la forma de hoja lanceolada y el alto NPSV, va depender del fondo genético en el que ambos caracteres se expresen. Este fondo genético va a estar caracterizado por los parentales utilizados en la obtención de las poblaciones, que son los que aportan la variabilidad que se expresa en las generaciones segregantes, por el tipo de población utilizada y fundamentalmente por el tamaño de las mismas.

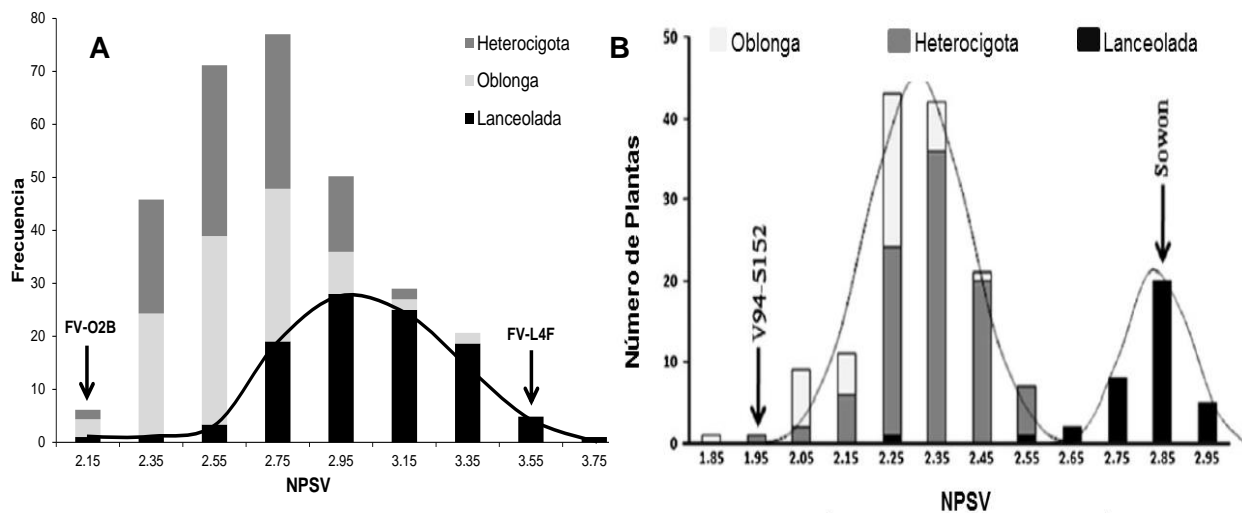


Figura 29. Histograma de frecuencias para el carácter número promedio de semillas por vaina (NPSV), discriminando a los individuos por su morfología foliar. **A.** Población F₂ J3 (1050 individuos) derivada del cruzamiento entre FV-L4F y FV-O2B: parentales de alto y bajo NPSV, respectivamente. **B.** Figura adaptada del trabajo de Jeong et al. (2011), población caracterizada RC₃F₂ (309 individuos).

Relacionado con el gen lanceolado, diversos autores (Dinkins et al., 2002; Jeong et al., 2011; Sayama et al., 2017) han sugerido que el mismo podría generar un efecto pleiotrópico incrementando el NPSV. Para este estudio, dicho efecto no sería suficiente para lograr que se expresen altos valores de NPSV. De hecho, se detectaron genotipos lanceolados con muy bajo valor para dicho carácter (2,15-2,55). Esto último es esperable si se tiene en cuenta a partir de los datos presentados en esta Sección, que al menos cuatro regiones estarían involucradas en la regulación del NPSV y por lo tanto, la expresión de elevados

valores de NPSV ($> 3,5$), va a depender de que se acumulen por lo menos los cuatro alelos que incrementan dicha característica.

Desde el punto de vista molecular, a partir del mapeo genético de ambos caracteres (forma de hoja y NPSV) en la población de RILs J14, se pudo detectar la presencia de un QTL (*qnpsv-4*) que explicó el mayor porcentaje de la variación fenotípica observada para el carácter NPSV (42-44 %) a 3 cM del gen *Ln*, sugiriendo la existencia de ligamiento entre ellos.

Teniendo en cuenta estos resultados, en caso de que el QTL próximo al gen *Ln* pueda ser validado en otro fondo genético y a una distancia similar, podría decirse que si bien no es posible descartar con los datos obtenidos en este estudio que haya pleiotropía del gen que regula la forma de hoja sobre el NPSV, tampoco podría descartarse que ambos caracteres estén ligados. Los resultados presentados en esta Sección tienen una fuerte impronta para sugerir que el ligamiento y las posibles recombinaciones serían los responsables de las variaciones observadas junto al gen *Ln* en coincidencia con lo planteado en su momento por Domingo (1945) y Zhu y Sun (2006).

En la actualidad con el desarrollo de las nuevas técnicas y los métodos de genética cuantitativa se puede lograr un mejor enfoque para dilucidar las causas que inciden en el grado de asociación que se establece entre estos dos caracteres.

II.2.6. CONCLUSIONES

Los resultados informados en esta Sección aportan al conocimiento de las bases genéticas que regulan la expresión del carácter alto porcentaje ($\geq 60\%$) de vainas de cuatro semillas en soja.

La población utilizada para la caracterización genética y molecular del NPSV, obtenida de líneas experimentales desarrolladas en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, presentó variancia genética principalmente aditiva para dicho carácter. La variabilidad generada en la población permitió identificar cuatro QTLs con efecto mayor asociados al NPSV que se mantuvieron estables en los dos ambiente evaluados, situados en los GLM F, L e I en un fondo genético de buen comportamiento agronómico. Uno de los resultados mas destacables de esta Sección es que los QTLs presentes en los GLM F y L corresponden a nuevas regiones no citadas previamente en la literatura como asociadas al carácter NPSV.

Para los cuatro QTLs identificados se detectaron efectos aditivos positivos que incrementan el NPSV en los alelos presentes en el parental FV-L4D. Sin duda, el disponer de MM-SSR ligados a los alelos que incrementan el NPSV permitirá, en caso que los mismos sean validados en otros fondos genéticos, mejorar la eficiencia en un programa de mejoramiento conducido a la incorporación del carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas ($\geq 60\%$) a genotipos comerciales de soja a través de la SAM.

La asignación de los distintos QTLs a un grupo de ligamiento molecular conocido del mapa genético de soja, podrá ser empleado como punto de partida en la identificación de genes que estarían involucrados en la regulación del carácter alto porcentaje de vainas de cuatro semillas, con el fin último de lograr su aislamiento y clonado.

El estudio conjunto de los caracteres forma de hoja y NPSV en el contexto genético utilizado en esta Tesis, permitió demostrar que la asociación entre el gen lanceolado y el alto NPSV no es absoluta y que a su vez, el grado de asociación que se establece entre ambos caracteres depende del fondo genético en el que los mismos se expresen. Por otra parte, los resultados del análisis molecular posicionaron uno de los QTLs (*qnpsv-4*) asociados al NPSV cercano al gen *Ln*, sugiriendo que la causa genética que determinaría la asociación entre los caracteres forma de hoja y NPSV en este estudio sería ligamiento genético.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN GENERAL

El NSS es el componente más asociado al rendimiento en soja, así como también en otros cultivos de granos. El NSS depende del NVS y del NPSV. Dado que el NPSV es un componente que presenta alta regulación genética y está poco influenciado por el ambiente (Capítulo II, Sección 2, Tabla 18), las variaciones que se observan en el NSS están fuertemente asociadas con variaciones en el NVS.

Actualmente está ampliamente aceptada la relación $NSS = f(TCC_{R2-R5})$, indicando que el NSS estaría limitado por la fuente (Egli y Zhen-wen, 1991; Board et al. 1995; Board y Harville, 1998). Sin embargo, dicha asociación no se cumple para todo el rango de TCC que pueden encontrarse en situaciones de cultivo. En particular, en situaciones donde la TCC no es limitante otro/s factor/es podrían estar regulando el número de estructuras reproductivas en canopeos de soja (Quijano, 2015; Quijano et al., 1998; Quijano y Morandi, 2011). Por otro lado, el modelo anterior solo considera el rol de la radiación a partir de su función como fuente de energía en el proceso fotosintético (a través de la relación que existe entre la TCC y la RI). En este punto, es importante tener en cuenta que existen evidencias que sugieren que la radiación fotomorfogénica (más específicamente la relación R/RL y/o la cantidad de A) podrían estar modulando el número de vainas en soja (Quijano, 2015; Quijano y Morandi, 2011).

Tanto la cantidad de radiación fotosintética que llega a los distintos estratos del canopeo como así también la radiación fotomorfogénica depende del IAF del cultivo. A su vez, el IAF puede variar como resultado de prácticas de manejo (como la densidad de siembra o el espaciamiento entre surcos), o también debido a caracteres morfológicos como la forma de los folíolos. Considerando los posibles efectos de la morfología foliar sobre la captación de la radiación fotosintética y fotomorfogénica es que se plantearon las dos primeras hipótesis de esta Tesis, las cuales se pusieron a prueba en los experimentos presentados en el Capítulo I.

La hipótesis 1 indicaba que *canopeos de plantas con hojas con folíolos lanceolados mejoran la intercepción de la radiación por unidad de área foliar respecto de su contraparte con folíolos oblongos*.

Los resultados presentados en el Capítulo I demostraron claramente que las líneas L permitieron que mayores niveles de RFA ingresaran a los estratos medios del canopeo.

Como era de esperarse las diferencias entre L y O fueron mayores en BD que en AD (Figura 6).

Similares resultados en cuanto a la penetración de la radiación fueron observados por Hicks et al. (1969), Suh-Sugkee et al. (2000) y Wells et al. (1993).

Si bien las líneas L desarrollaron en promedio menores IAF comparadas con las líneas O alcanzaron valores de RI similares, lo que produjo diferencias en la ERI entre las líneas L y O. La mayor ERI de las líneas L respecto de las O durante la etapa vegetativa indica que las líneas L presentan mayor eficiencia de captación de la RFA en relación a las líneas O. Las variaciones informadas entre las líneas L y O para la ERI representan resultados originales, no informados en la bibliografía hasta el momento y permiten aceptar la primera hipótesis de trabajo.

Una posible explicación para estos resultados sería que los folíolos de las líneas L fueran más sensibles al sombreado y lograran modificar su orientación para mejorar así la captación de la radiación, comparados con los folíolos de las líneas O. En este contexto, Gautier et al. (1997) informaron que cambios en los niveles de luz azul controlan el movimiento de los folíolos, a través de modificaciones en la longitud y el ángulo de los pecíolos en trébol blanco. Dado que este aspecto no fue medido en este trabajo, poner a prueba esta hipótesis requiere de nuevos experimentos en los que la orientación de los folíolos sea tomada en consideración.

Por otra parte, la mayor ERI de las líneas L respecto de las O, durante la etapa vegetativa, posiblemente haya sido la causa de los incrementos observados en la TAN que permitieron compensar el menor IAF de las líneas L respecto de las O, equiparando sus respectivas TCC (Tabla 3).

Como se mencionó anteriormente, el IAF cumple un doble rol en el canopeo: por un lado, intercepta radiación fotosintética y por otro lado, modifica la calidad del ambiente lumínico en el interior del mismo. Es por ello que considerando esta segunda función del IAF se planteó la segunda hipótesis que establecía que: *Canopeos de plantas con hojas con folíolos lanceolados aumentan la relación R/RL en su interior respecto de su contraparte con folíolos oblongos y este aumento está directamente asociado con el número de vainas iniciadas.*

Las líneas L presentaron mayores valores de R/RL en el interior del canopeo comparadas con las líneas O, hasta el ICLS (Figura 5) ampliándose estas diferencias en BD. Estos resultados constituyen la primera evidencia experimental de que cambios en la morfología foliar modifican *per se* el balance de longitudes de onda con efecto

fotomorfogénico en canopeos de soja. A su vez, las vainas iniciadas presentaron una asociación lineal y directa con los niveles de R/RL en el interior del canopeo (Figura 9). Esta asociación pudo ser explicada utilizando una única función que incluía tanto a las líneas L como las O, tanto en BD como en AD. Cuando se compararon ambas morfologías foliares se comprobó que las líneas L presentaron siempre mayores valores de vainas iniciadas y de relación R/RL comparadas con las líneas O. Por otro lado, el número de vainas iniciadas no estuvo asociado con la TCC_{R2R5} , y además, presentó una relación inversa con el IAF y con la RI. Por lo tanto, en base a los resultados presentados anteriormente la segunda hipótesis planteada en esta Tesis es aceptada.

La falta de asociación entre las vainas iniciadas y la TCC_{R2R5} sugiere que la disponibilidad de asimilados no fue un factor limitante para la iniciación de vainas en nuestras condiciones experimentales. Esto concuerda con trabajos previos en los que se ha planteado que los requerimientos de asimilados para el inicio de crecimiento de vainas son relativamente bajos (Brun y Betts, 1984; Heitholt et al., 1986; Quijano, 2015). El conjunto de los resultados mencionados plantean la necesidad de revisar el paradigma actual que postula que el establecimiento de las estructuras reproductivas en soja está controlado por la disponibilidad de asimilados (estimada como la TCC). Como se explicó en el Capítulo I esta asociación no se sostiene para todo el rango de TCC que se pueden encontrar en el cultivo. Las conclusiones obtenidas en esta Tesis, en canopeos de distinta morfología foliar fueron similares a las obtenidas en experimentos con defoliaciones artificiales (Quijano, 2014), y pudieron explicarse utilizando el marco conceptual desarrollado previamente (Capítulo I, Discusión). Tomados en conjunto la información disponible soporta la hipótesis de que la regulación del número de vainas iniciadas en canopeos de soja, en condiciones de alta productividad ($TCC \geq 14-15 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$) responde a estímulos fotomorfogénicos.

En este contexto, se postula que la incorporación del factor fotomorfogénico al diseño de nuevos modelos de estimación de componentes numéricos del rendimiento mejorará su valor predictivo.

La hipótesis 3, indicaba que *el aporte del aumento del número de semillas por vaina al incremento del número de semillas totales es independiente del número de vainas.*

De los dos componentes que explican el NSS (i.e. NVS y NPSV), el NPSV es el carácter que presenta mayor regulación genética. Esto último se pudo evidenciar tanto en los resultados obtenidos en los ensayos del Capítulo I, donde no se observaron diferencias en el $NPSV_D$ entre experimentos, densidades, ni interacción entre los factores evaluados (Tabla 7) como así también a partir de la caracterización genética que se realizó en el

Capítulo II ($H^2 = 0,98$; Tabla 18). Además, el $NPSV_D$ de las líneas L fue consistentemente mayor al de las líneas O, para todo el rango de NVS explorado en esta Tesis (Figura 10) determinando que, a igualdad de NVS las líneas L presentarían siempre mayores valores de NSS que las O (Figura 10). Estos resultados claramente indican que no existe compensación entre los componentes NVS y NPSV y por lo tanto, el aporte que genera un incremento en el NPSV sobre el NSS es independiente del NVS. Estos resultados permiten aceptar la tercer hipótesis planteada en esta Tesis.

Además, a los efectos de realizar una comprobación adicional para ver si el aumento en el NPSV podía estar negativamente correlacionado con el número de vainas por planta (n° vainas. pl^{-1}) se analizó la relación entre estas variables en la población de RILs J14 (Figura 30). En la Figura 30 se puede observar que no existe asociación entre el NPSV y el n° vainas. pl^{-1} , corroborando los resultados obtenidos en los experimentos del Capítulo I.

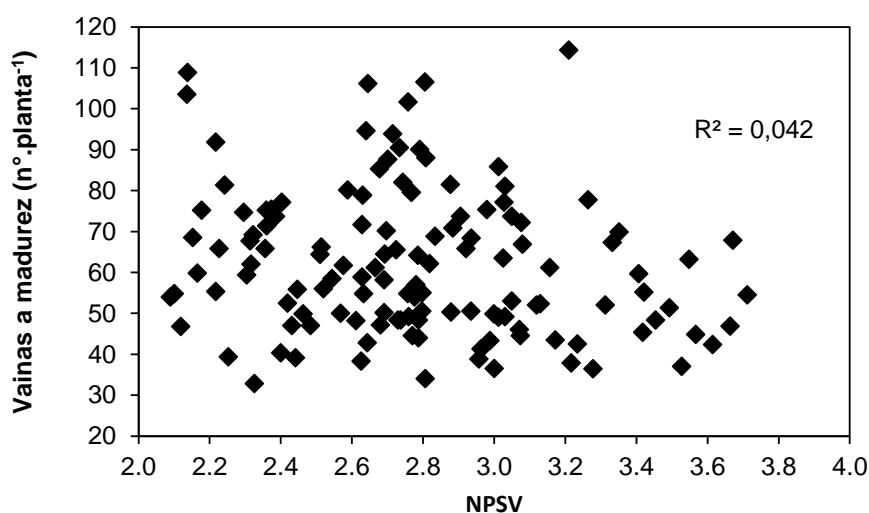


Figura 30. Vainas por planta a madurez en función del número promedio de semillas por vaina (NPSV), para la población de RILs J14, evaluada en la campaña 2016/17. Ver condiciones de este ensayo en Cap. II, Sec. 2, M y M).

Por otro lado, el mayor rendimiento observado para las líneas L-BD pone en evidencia que algunas inferencias sobre las relaciones que se establecen entre el NSS y el PUS o entre NPSV y el PUS (Dinkins et al., 2002; Mandl y Buss, 1981; Sayama et al., 2017), deberían ser reconsideradas. Cuando se dice que el aumento en un componente del rendimiento será compensado por el descenso de otro y por lo tanto el rendimiento no será modificado, se está planteando una situación de suma cero, lo que puede o no suceder. Por ejemplo, el incremento observado en el NSS de L-BD respecto de O-BD (4187 vs. 2983 semillas para L-BD y O-BD, respectivamente) no fue compensado por el menor PUS de las líneas L respecto de las O (151 vs. 164 mg para L y O, respectivamente). El mayor NSS que

presentaron las líneas L en BD en relación a las líneas O, les permitió alcanzar los mayores rendimientos. Por el contrario, en el caso de las líneas O-AD, a pesar de tener un mayor PUS e igual NVS que las líneas L-AD, no tuvieron mayores rendimientos, ya que el mayor NPSV_D de las líneas L-AD fue suficiente para aumentar su NSS y compensar el menor PUS respecto de las líneas O, equiparándose así los rendimientos en AD (Capítulo I, Tabla 7).

Por otro lado, en relación a la asociación negativa que se ha establecido entre el NPSV y el PUS, cuando se analizaron los PUS de las cuatro líneas evaluadas, las líneas FV-15L (NPSV = 3,6) y FV-9O (NPSV = 2,9), presentaron un PUS = 158 mg para ambos genotipos, no obstante sus diferencias en el NPSV (Capítulo I, Resultados). A su vez, datos preliminares obtenidos de la población de RILs J14 mostraron claramente la falta de asociación entre los componentes NPSV y PUS ($R^2 = 0,0001$; Figura 31). En la Figura 31 también se puede apreciar la variabilidad que existe en la población J14 para dichos componentes.

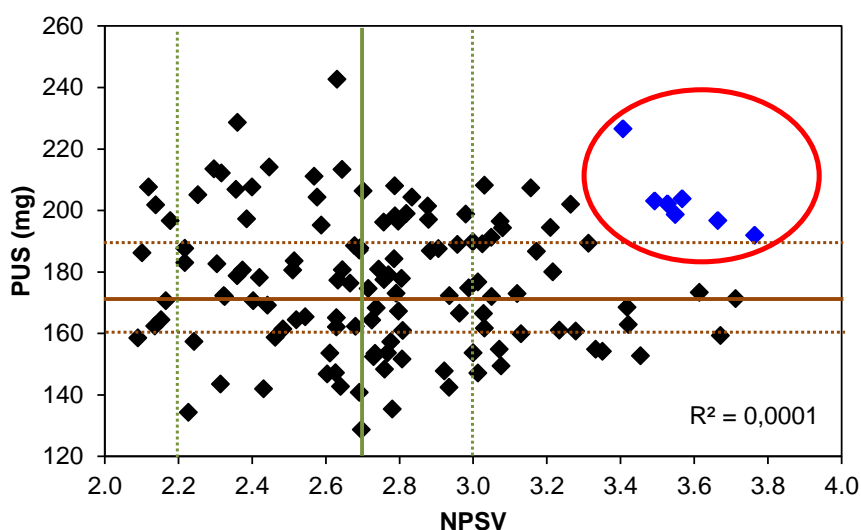


Figura 31. Peso unitario de semillas (PUS, mg) en función del número promedio de semillas por vaina (NPSV), para la población de RILs J14 evaluada en la campaña 2016/17. La línea vertical sólida de color verde representa el NPSV promedio (2,7) de los cultivares comerciales caracterizados en el Capítulo I, en la Introducción (Figura 2). Las líneas punteadas del mismo color representan el rango para dicho carácter (2,2-3,0) de los mismos cultivares. La línea horizontal sólida de color marrón representa el peso unitario promedio de los cultivares citados anteriormente (171 mg). Las líneas punteadas del mismo color representan el rango para dicho carácter (160-190 mg) de los mismos cultivares. Los puntos de color azul corresponden a los genotipos de la RIL J14 que presentaron, conjuntamente, mayores valores de NPSV y de PUS que los respectivos máximos de los cultivares comerciales.

Los resultados presentados anteriormente claramente demuestran que si bien es posible que bajo determinadas circunstancias de cultivo se produzcan compensaciones entre algunos de los componentes numéricos que determinan el rendimiento, dichas

compensaciones no son absolutas. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las variedades de soja presentes en el mercado Argentino tienen mayoritariamente vainas de dos y de tres semillas, con un techo en cuanto a NPSV de alrededor de 3,0. Para alcanzar el objetivo de incrementar el NPSV a niveles de 3,6 o mayores, sería necesario incrementar el porcentaje de vainas de cuatro semillas de dichas variedades. Estos incrementos podrían lograrse sin disminuir el PUS, e incluso incrementándolo (Figura 31, círculo rojo).

Además, el hecho que las regiones en las cuales se han encontrado QTLs asociados al PUS (Kato et al., 2014; Kulkarni et al., 2016; Mian et al., 1996) son diferentes a las regiones en las que se han informado QTLs asociados al NPSV (Capítulo II, Sección 2, Tabla 23; Jeong et al., 2011; Liu et al., 2011; Yang et al., 2013) indica que los genes que controlan el NPSV y el PUS son diferentes e independientes. A la misma conclusión llegaron Gnan et al., 2014, en estudios con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto sería posible manipular ambos caracteres individual o conjuntamente con el objetivo de mejorar el potencial de rendimiento de las variedades actuales.

Los resultados presentados plantean además la necesidad de reconsiderar las conclusiones previas acerca de que la incorporación del carácter forma de hoja lanceolada y alto número de semillas por vaina no generaría ninguna ventaja adicional que justificara su incorporación en los programas de mejoramiento (Hicks et al., 1969; Hiebsch et al., 1976; Jain y Singh, 1978; Mandl y Buss, 1980; Rotzler et al., 2009).

Considerando las potenciales ventajas que podrían tener la incorporación de los caracteres hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas ($NPSV \geq 3,6$) sobre la productividad del cultivo de soja, resulta interesante poder introgresar ambos caracteres en los programas de mejoramiento actuales. Para ello es necesario conocer las bases genéticas que los determinan. Es por ello que en el Capítulo II, Sección 1 y 2 se abordaron aspectos genéticos y moleculares de los caracteres hoja lanceolada y alto porcentaje de vainas de cuatro semillas con el fin de generar información útil que pueda ser empleada en la mejora de ambos caracteres.

En el caso del carácter forma de hoja, en el Capítulo II, Sección 1, el estudio molecular permitió detectar 13 MM-SSR ligados al carácter hoja lanceolada en materiales de buen comportamiento agronómico. Siete de esos 13 MM-SSR han sido validados en al menos dos fondos genéticos distintos (Bianchi, 2018; Jeong et al., 2011; Song et al., 2004). Los otros seis que han sido detectados en esta Tesis, si bien han sido validados en dos generaciones distintas (F_2 y RILs) de una misma población (J14), deberían ser validados en otro fondo genético previo a su uso en la SAM. El hecho de contar con materiales de buen

comportamiento agronómico y MM-SSR validados, permitirá que las líneas evaluadas en esta Tesis y los MM-SSR sean utilizados en un esquema de retrocruzas destinado a la introgresión rápida del gen lanceolado a germoplasma elite de soja.

A diferencia del carácter forma de hoja, la información que se dispone actualmente sobre las bases genéticas que regulan el alto porcentaje de vainas de cuatro semillas ($NPSV \geq 3,6$) es más limitada. Además, el control genético que presenta dicho carácter es mucho más complejo debido a su base genética cuantitativa. En el Capítulo II, Sección 2, se presentó evidencia que corrobora la naturaleza cuantitativa del carácter bajo estudio. Asimismo, se encontró una elevada H^2 para el NPSV dando cuenta de la importancia que adquiere la caracterización de las bases genéticas que regulan dicho carácter. El hecho de que la H^2 sea elevada y que solo una muy baja proporción de la variabilidad fenotípica observada para el NPSV es explicada por la variancia ambiental, indica que el carácter tiene un fuerte control genético. Esto último se puso de manifiesto tanto en los resultados obtenidos en los experimentos del Capítulo I de esta Tesis (Capítulo I, Resultados, Tabla 7), como así también en otros conducidos por otros autores (Board y Harville, 1998; Egli, 1998; Quijano, 2015; Shibles et al., 1975), en los que se ha observado que el NPSV muestra poca variabilidad frente a diferentes condiciones de cultivo en comparación con el resto de los componentes numéricos del rendimiento. Es justamente la alta heredabilidad (98%) que presenta el carácter NPSV lo que lo hace interesante desde el punto de vista del mejoramiento genético. Así, la mejora que se logre en el NPSV no solo va a ser independiente del resto de los componentes de rendimiento, sino que además se va a mantener estable en distintos ambientes.

El análisis genético del NPSV permitió identificar cuatro QTLs con efecto mayor asociados a dicho carácter en los GLM F, L e I, que se mapearon consistentemente en la misma posición y mantuvieron efectos similares en los dos años evaluados, tratándose por lo tanto de QTLs estables. Lo más destacable de los QTLs detectados, asociados al NPSV, es que los que están presentes en los GLM F y L, corresponden a nuevas regiones no identificadas previamente. Además, para las cuatro regiones encontradas se detectaron efectos aditivos positivos que incrementan el NPSV en los alelos presentes en el parental FV-L4D. La importancia de haber detectado MM-SSR ligados a los alelos que incrementan el NPSV radica en que, una vez validados en otros contextos genéticos, podrán ser utilizados en los esquemas de SAM para acelerar la incorporación de la característica alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a cultivares comerciales. Por otra parte, el hecho de haber detectado a través de distintas metodologías de análisis de QTLs las mismas regiones asociadas al NPSV y que dichas regiones se hayan mantenido estables en al menos dos

ambientes, demuestra la consistencia de los resultados presentados en este estudio respecto de la estabilidad ambiental de los QTLs identificados.

Por otro lado, es importante destacar la importancia de la información generada en el Capítulo II, Sección 2, como paso inicial para la localización, aislamiento y clonado de los genes que podrían estar involucrados en la expresión del alto porcentaje de vainas de cuatro semillas. En un análisis *in silico* preliminar de las secuencias incluidas en los intervalos definidos por los MM-SSR que flanquean a los QTLs detectados a través de las distintas metodologías, utilizando la herramienta Genome Browser disponible en la base de datos de soybase (<https://soybase.org>), se detectó la presencia de un elevado número de genes, muchos de ellos con funciones desconocidas, presentes en dichos intervalos. En la Tabla 25 se muestra un resumen de las cuatro regiones analizadas, el intervalo donde se encontrarían los QTLs, el tamaño de dicho intervalo presentado en pb y cM y finalmente el número de genes detectados dentro de cada intervalo.

Tabla 25. QTLs identificados a través del mapeo multicarácter por intervalos compuestos, intervalo dentro del cual se encontraron comprendidos, tamaño del intervalo en pares de bases (pb), tamaño del intervalo en cM y cantidad de genes incluidos en cada caso.

QTL ¹	GLM/CR ²	Intervalo	Intervalo en pb	Tamaño (pb)	Tamaño (cM)	Genes
<i>qnspv-1</i>	F/13	Satt149-Sat_298	1.916.567-4.976.853	3.060.286	9,4	222
<i>qnspv-2</i>	F/13	Sat_234-Satt334	26.460.696-28.415.974	1.955.278	8,4	203
<i>qnspv-3</i>	L/19	Satt166-GMES1723	42.415.497-44.938.026	2.522.529	3,0	284
<i>qnspv-4</i>	I/20	Sat_268-Sat_418	35.176.184-38.389.893	3.213.704	26,9	343

⁽¹⁾ QTL (quantitative trait loci). QTLs identificados asociados al número promedio de semillas por vaina (NPSV).

⁽²⁾ GLM grupo de ligamiento molecular. CR: cromosoma donde se detectaron los QTLs.

Es necesario aclarar que, debido al gran número de genes encontrados en cada una de las regiones identificadas, resulta difícil postular algún gen como participe de la regulación del carácter bajo estudio. Para ello, es necesario validar primero los QTLs detectados en otros fondos genéticos (tarea que ya fue iniciada y para la cual se dispone poblaciones derivadas de cruzamientos entre genotipos con alto porcentaje de vainas de cuatro semillas y variedades comerciales de distintos grupos de madurez). En una segunda etapa será necesario delimitar una región más estrecha a través de un mapeo fino, que

permita reducir el número de genes candidatos que podrían estar involucrados en la determinación del alto porcentaje de vainas de cuatro semillas.

El vínculo que presentan las dos secciones del Capítulo II, es la asociación que se ha establecido entre el carácter forma de hoja y el NPSV. Teniendo en cuenta el contexto genético utilizado en esta Tesis, uno de los objetivos que se planteó en el Capítulo II, Sección 2, fue *evaluar la asociación de los caracteres forma de hoja y NPSV en un fondo genético donde se expresan altos porcentajes de vainas de cuatro semillas ($\geq 60\%$)*. Asociado con este objetivo, y considerando la información relacionada disponible en la literatura, se planteó la hipótesis molecular específica que indicaba que: *El grado de asociación entre los caracteres hoja lanceolada y el alto NPSV depende del fondo genético en el que ambos caracteres se expresan*.

A partir del análisis conjunto de los caracteres forma de hoja y NPSV en las poblaciones caracterizadas en esta Tesis, se pudo observar que los genotipos L segregaron tanto con bajos (2,15) como con elevados (3,75) NPSV. Mientras que los genotipos de bajo NPSV carecían de vainas de cuatro semillas, los genotipos de alto NPSV presentaban dicha categoría de vainas en alta proporción. El hecho de haber contado con parentales divergentes para el carácter NPSV y de haber trabajado con poblaciones de gran tamaño (1050 individuos), permitió que se expresara una mayor variabilidad en el NPSV, tanto en los genotipos L como así también en los genotipos O. Además, aumentó la probabilidad de que aparecieran individuos recombinantes que son la prueba de que los caracteres hoja lanceolada y alto NPSV no necesariamente van a cosegregar siempre juntos. Estos resultados difirieron de los obtenidos por Jeong et al. (2011), quienes habían observado que los genotipos lanceolados se correspondían siempre con altos NPSV. Estas diferencias, podrían explicarse por: i) los distintos parentales utilizados para la obtención de las poblaciones, así como el tipo de población evaluada, ii) el diferente grado de superposición que presentaron los genotipos L y O para los distintos valores de NPSV en las poblaciones analizadas, iii) y las diferencias en el tamaño de las poblaciones caracterizadas (Capítulo II, Sección 2, Discusión).

Por lo tanto, los resultados discutidos anteriormente demuestran que cambios en el fondo genético conducen a que el grado de asociación que se establece entre los caracteres hoja lanceolada y alto NPSV sea diferente y permiten aceptar la hipótesis molecular específica planteada.

Además, los resultados presentados y discutidos demuestran la importancia que tiene la correcta elección de los parentales, el tipo de población a estudiar y

fundamentalmente el tamaño de dicha población. Estas características van a determinar que el nivel de información obtenida de los caracteres bajo estudio sea diferente.

Un interrogante que hasta el momento no ha sido resuelto de manera inequívoca es la causa genética que determina la asociación entre los caracteres forma de hoja y NPSV. En un inicio se propuso que la misma podría deberse al ligamiento entre el gen que determina la hoja lanceolada (*ln*) con el locus o *loci* que determinan el alto NPSV (Domingo, 1945; Takahashi, 1934). Sin embargo, en los últimos trabajos en los que se ha caracterizado dicha asociación se ha sugerido que la misma se debería a un fenómeno de pleiotropía (Dinkins et al., 2002; Jeong et al., 2011; Sayama et al., 2017). El análisis molecular conducido en el Capítulo II, Sección 2, permitió detectar que uno de los QTLs (el *qnpsv-4*) que explicó el mayor porcentaje de la variación fenotípica observada para el carácter NPSV, se encontraba cercano al gen *Ln*, lo que indicaría que se trata de genes independientes, estrechamente ligados. No obstante, para poder determinar con certeza si efectivamente se trata de *loci* distintos sería necesario primeramente validar el QTL encontrado en dicha región, luego mejorar la cobertura del genoma en esa zona, a través de la incorporación de otro tipo de marcadores como SNPs, que permitan realizar un mapeo fino y así postular genes candidatos que estén involucrados en la regulación del NPSV en esa región. Además, también sería necesario verificar que esos genes sean distintos al gen *Gm-JAG1* que ha sido postulado como el gen que regula la morfología foliar en soja y que induciría un fenotipo pleiotrópico sobre el NPSV (Sayama et al., 2017).

Finalmente, uno de los aspectos a destacar es la riqueza del material genético generado en el marco de esta Tesis. Esto permitió generar suficiente variabilidad en las poblaciones para responder a los distintos objetivos e hipótesis planteados. Asimismo, la disponibilidad de este material genético posibilitará el diseño de otros experimentos en el futuro para responder nuevos interrogantes. Por otro lado, la información generada a partir de este estudio no solo aporta al conocimiento básico, como puede ser el entendimiento de los distintos factores que regulan la generación de estructuras reproductivas en soja o la regulación génica de los caracteres involucrados, sino que además tiene un componente aplicado, relacionado directamente con el mejoramiento del cultivo. En este último punto es importante destacar que actualmente el mercado Argentino no dispone de cultivares con alto porcentaje de vainas de cuatro semillas. Con lo cual, el haber desarrollado líneas experimentales con alto porcentaje de vainas de cuatro semillas (> 60 %) y de buen comportamiento agronómico, posibilita su utilización como parentales en planes de mejoramiento tendientes a incorporar dicho carácter a germoplasma elite de soja.

Investigaciones y objetivos futuros:

Uno de los aportes al conocimiento de esta Tesis fue la de presentar la primera evidencia experimental de que cambios en la morfología foliar modifican el balance de longitudes de onda con efecto fotomorfogénico en el interior del canopeo y el impacto de esos cambios sobre la iniciación de vainas en soja.

Sin embargo, como se explicó antes, las líneas utilizadas en los experimentos del Capítulo I fueron del GM V largo por lo que, aún cuando su siembra se retrasó hasta finales de Diciembre, desarrollaron un crecimiento vegetativo extraordinario en nuestra latitud ($33^{\circ} 1' S$) y con las condiciones ambientales de los experimentos informados, equiparando las diferencias entre ambas morfologías foliares durante la etapa reproductiva temprana. Ensayos en latitudes más bajas, a las cuales estos GM están mejor adaptados, o el uso de genotipos de GM menores (i.e. III o IV) permitirán explorar los efectos de la morfología foliar en canopeos menos desarrollados.

Por otra parte, los experimentos se focalizaron en el estudio de los efectos de cambios en la morfología foliar durante las etapas vegetativa y reproductiva temprana. No obstante, no se puede descartar *a priori* efectos de la morfología foliar en etapas posteriores. Asimismo, el efecto fotomorfogénico podría también manifestarse en etapas posteriores, por lo que ambos aspectos podrían ser motivo de futuros estudios.

Durante la etapa vegetativa se observó que las líneas L presentaron mayores valores de TAN comparadas con las líneas O. Los cambios en dicha variable podrían estar relacionados con una mejor distribución de la RFA en el interior del canopeo de las líneas L, como así también podrían deberse a diferencias genotípicas asociadas con distintos parámetros fisiológicos. Resultados preliminares, no informados en esta Tesis, obtenidos a partir de la evaluación de un nuevo par de líneas (FV-35L/FV-35O), durante la campaña 2015/16, mostraron mayores valores de tasa fotosintética en la línea L respecto de la O. Las mayores diferencias se detectaron en el estadio R3 (22,75 y 14,24 $\text{mgCO}_2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para L y O, respectivamente, $P < 0,05$). Si bien estos resultados son preliminares, serían un indicio de que la mayor TAN detectada en las líneas L no solo se explicaría por una mayor ERI sino que además podría estar relacionada con una mayor tasa fotosintética por unidad de área foliar. Estos resultados están en línea con los informados por Sung y Chen (1989), quienes observaron que los genotipos lanceolados presentaban mayor tasa fotosintética respecto de los genotipos oblongos debido a una mayor actividad de la Rubisco y a un mayor contenido de cloroplastos por unidad de área foliar. Futuras evaluaciones deberían incluir la medición de parámetros asociados con la capacidad fotosintética de los folíolos como: tasa

fotosintética, contenido de clorofila, contenido de Rubisco, número de cloroplastos, actividad enzimática, conductividad estomática, entre otros; que permitan explicar en mayor detalle las diferencias observadas entre las diferentes morfologías foliares.

Por otro lado, como se mencionó arriba, la incorporación de la característica alto porcentaje de vainas de cuatro semillas a germoplasma comercial de soja de GM más cortos ya ha sido iniciada y, una vez estabilizadas, estas líneas serán utilizadas en ensayos destinados a cuantificar el impacto relativo de la incorporación de esta característica a distintos GMs.

El análisis molecular permitió identificar cuatro QTLs asociados con el carácter NPSV, que se mantuvieron estables y que presentaron efectos similares en los dos ambientes analizados. Si bien el haber validado dichos QTLs en dos ambientes diferentes es importante desde el punto de vista de la consistencia de los resultados, no está demostrado aún si los mismos se mantendrán estables ante cambios en el contexto genético. Esto se debe a que un QTL favorable asociado a la presencia del alelo correspondiente a un parental determinado, puede modificar su efecto cuando este se cruza con otro parental, debido por un lado, al cambio en el fondo genético, y por otro, por posibles interacciones con otros QTLs.

Además de la población de RILs J14 que se utilizó para realizar el mapeo genético de los caracteres forma de hoja y NPSV, también se dispone de otras dos poblaciones (N3 y N9) en las cuales se validarán los QTLs identificados hasta el momento. Las poblaciones obtenidas, provienen de cruzamientos biparentales en los cuales uno de los parentales presenta alto porcentaje de vainas de dos semillas ($NPSV < 2,3$) y el otro alto porcentaje de vainas de cuatro semillas ($NPSV > 3,5$). Además de realizar la validación sobre estas poblaciones, se propone validar los QTLs identificados en las poblaciones obtenidas a partir de cruzamientos con cultivares comerciales que presentan un predominio de vainas de dos y tres semillas. Esto permitirá por un lado, probar la existencia de interacción de los QTLs en un fondo genético en el cual los parentales son más próximos entre sí para el carácter NPSV, y por otro lado, verificar los efectos y las posiciones de los QTLs detectados inicialmente.

Por otra parte, si bien la técnica de análisis de segregantes en grupo utilizada en este estudio es de gran utilidad para identificar QTLs con efectos mayores, que son los que finalmente se logran incorporar en los programas de mejoramiento a través de la SAM, es una metodología que podría fallar en la detección de QTLs con efectos menores y en la identificación de interacciones epistáticas entre ellos (Vikram et al., 2012). Por lo tanto, para

mejorar el análisis se propone: i) saturar con nuevos MM-SSR las regiones ya identificadas, ii) utilizar aquellos MM-SSR que resultaron polimórficos entre los parentales de la población de RILs J14 en el resto de los GLM analizados y que fueron desestimados a partir de los resultados del análisis de segregantes en grupo (Tabla 19), con el objeto de poder detectar nuevos QTLs en otras regiones distintas a las abordadas en este estudio.

Además, con el objetivo de mejorar el posicionamiento de los QTLs identificados, se propone iniciar la búsqueda de marcadores SNPs basados en secuenciación o GBS (acrónimo del inglés Genotyping by Sequencing) (Poland y Rife, 2012). La obtención de estos marcadores permitirá profundizar la caracterización molecular de la región genómica delimitada mediante los MM-SSR ya que presenta una precisión considerablemente mayor a la técnica de SSR. Para mejorar la exactitud del análisis se debería además incrementar la cantidad de genotipos evaluados, dado que, si bien para este estudio se caracterizaron 131 líneas, la población original (J14), cuenta con 519 líneas, de las cuales se dispone del ADN y de la información fenotípica.

La complementación del estudio con SNPs, permitirá realizar un mapeo fino de las regiones que resultaron asociadas al NPSV, que no solo será de gran utilidad en el mejoramiento, sino que además permitirá proponer gen/es candidatos que participen en la regulación de dicha característica, posibilitando posteriormente la realización de estudios funcionales (Hyten et al., 2010). Para realizar este tipo de estudios, es necesario en un primer paso, secuenciar el intervalo en donde se ha detectado el QTL, e identificar variantes nucleotídicas candidatas. A continuación se podría reemplazar un nucleótido por su variante, y observar si se modifica el fenotipo ante dicho reemplazo. Las pruebas que se pueden realizar para este estudio consisten en el silenciamiento de genes candidatos o la caracterización de mutantes de la especie (Glazier et al., 2002). En cualquiera de los dos casos, se produce una pérdida total o parcial de funcionalidad del gen de interés. Esto posibilita la comparación entre el genotipo control y el genotipo mutante. En caso de que existan diferencias fenotípicas entre ambos individuos se podría afirmar que el gen que se postuló como candidato, participaría en la regulación del carácter número promedio de semillas por vaina.

Otra alternativa que permitiría acelerar la búsqueda de genes candidatos asociados con la regulación del número de semillas por vaina, sería identificar primero en *Arabidopsis* aquellos genes que están relacionados con la determinación del número de semillas por silicua y ver si se encuentra el ortólogo correspondiente en soja, en las regiones delimitadas a partir del mapeo fino realizado con la técnica mencionada anteriormente. Relacionado a esto último, en *Arabidopsis*, se han detectado varios genes asociados al desarrollo de los

óvulos y a la regulación del número de semillas tales como: *APETALA2*; *SUPERMAN*; *INNER NO OUTER*; *SHORT INTEGUMENTS*; *BELL*; *AGAMOUS*; *HUELLENLOS* (Jiang y Lin, 2013).

A modo de ejemplo, uno de ellos *SHORT INTEGUMENTS (SIN1)* presenta su ortólogo en soja: *Glyma.19G261200* posicionado en el Cromosoma 19 entre las 50.422.661 y 50.435.271 pb. Dicho gen codifica una “Dicer homolog”. Dicer es una enzima que participa en el procesamiento del ARN. Mutaciones en este locus pueden generar entre otros efectos, la muerte de embriones, la transformación de los meristemas florales hacia un estado indeterminado y pueden producir defectos en el desarrollo de los óvulos.

Casualmente, en ese mismo cromosoma (19), se detectó el QTL *qnpsv-3* cercano al MM-SSR GMES1723, posicionado físicamente a 44.938.026 pb del inicio del cromosoma. La cercanía existente entre el marcador ligado al QTL identificado y el gen mencionado determina una región interesante para explorar en la búsqueda de genes que regulan el número de semillas por vaina en soja.

BIBLIOGRAFÍA

- ACSOJA (Asociación de la Cadena de la Soja Argentina), 2010. Informe Anual de la Cadena de Valor. Rosario, Argentina.
- Allard, R.W. (1956). Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hylgardia* 24:235-278.
- Anderson, J.A., S. Chao, and S. Liu. (2007). Molecular breeding using a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Sci.* 47, S-112 usin
- Andriani, J.M., Andrade, F.H., Suero, E.E., Dardanelli, J.L. 1991. Water deficits during reproductive growth of soybeans. I. Their effects on dry matter accumulation, seed yield and its components. *Agronomie* 11, 737-746.
- Bales, C., Zhang, G., Liu, M., Mensah, C., Gu, C., Song, Q., Hyten, D., Cregan, P., Wang, D. 2013. Mapping soybean aphid resistance genes in PI 567598B. *Theor Appl Genet* 126:2081–2091.
- Ballaré, C.L., Casal, J.J. 2000. Light signals perceived by crop and weed plants. *Field Crops Res.* 67:149-160.
- Bernard, A.L. & M.G. Weiss. 1973. Qualitative genetics. In Caldwell BE (ed.) *Soybean: Improvement, production and uses*. 1st ed. Agron. Monogr. 16. ASA, CSSA and SSSA, Madison WI, USA.
- Board, J. 2000. Light interception efficiency and light quality affect yield compensation of soybean at low plant populations. *Crop Sci.* 40, 1285-1294.
- Board, J.E. & Harville, B.G. 1994. A criterion for acceptance of narrow-row culture in soybean. *Agron. J.* 86:1103-1106.
- Board, J.E. & Harville, B.G. 1998. Late-planted soybean yield response to reproductive source/sink stress. *Crop Sci.* 38:763-771.
- Board, J. E. & Maricherla, D. 2008. Explanations for decreased harvest index with increased yield in soybean. *Crop science*, 48(5), 1995-2002.
- Board, J. E. & Modali, H. 2005. Dry matter accumulation predictors for optimal yield in soybean. *Crop science*, 45(5), 1790-1799.
- Board, J.E. & Tan, Q. 1995. Assimilatory capacity effects on soybean yield components and pod number. *Crop Sci.* 35:846-851.
- Boccalandro, H.E., Ploschuk, E.L., Yanovsky, M.J., Sanchez, R.A., Gatz, C., Casal, J.J. 2003. Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of potato crops. *Plant Physiol.* 133, 1539-1546.

- Bolstein, D., White, R.L., Skolnick, M.; Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brevedan, R.E., Egli, D.B., Leggett, J.E. 1978. Influence of N nutrition on flower and pod abortion and yield of soybeans. *Agronomy Journal* 70, 81-84.
- Brim, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science.* 6: 220.
- Brim, C.A. 1973. Quantitative genetics and breeding. In: Caldwell BE (ed) *Soybeans: improvement, production, and uses.* American Society of Agronomy, Madison, pp 155–186
- Brun, W.A., K.J. Betts. 1984. Source/sink relations of abscising and non-abscising soybean flowers. *Plant Physiol.* 75, 187-191.
- Burr, B.; Burr, F.A.; Thompson, K.H.; Albertsen, M.C.; Stuber, C.W. 1988. Gene mapping and recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118:519–26.
- Calvino, P. A., Sadras, V. O., & Andrade, F. H. 2003. Development, growth and yield of late-sown soybean in the southern Pampas. *European Journal of Agronomy*, 19(2), 265-275.
- Casal, J.J., Sanchez, R.A., 1998. Phytochromes and seed germination. *Seed Sci. Res.* 8, 317±329.
- Casal, J. J. & Smith, H. 1989. The function, action, and adaptive significance of phytochrome in light-grown plants. *Plant, Cell and Environment* (1989) 12, 855-862.
- Chen, Y., 1998. Genetic analysis of seed number per pod in soybean. *Soybean Sci.* 17, 115-119.
- Chen, Y., & Nelson, R. L. 2004. Evaluation and classification of leaflet shape and size in wild soybean. *Crop science*, 44(2), 671-677.
- Chiesa, M. A., Cambursano, M. V., Pioli, R. N., & Morandi, E. N. 2017. Molecular mapping of the genomic region conferring resistance to soybean stem canker in Hutcheson soybean. *Molecular Breeding*, 37(5), 65.
- Chung, J., Babka, H.L., Graef, G.L., Staswick, P.E., Lee, D.J., Cregan, P.B., Shoemaker, R.C., Specht, J.E. 2003. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Sci* 43:1053–1067.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963–971.

- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1491), 557-572.
- Concibido, V.C., La Vallee, B., Mclaird, P., Pineda, N., Meyer, J., Hummel, L., Yang, J., Wu, K., Delannay, X. 2003. Introgression of a quantitative trait locus for yield from *Glycine soja* into commercial soybean cultivars. *Theor Appl Genet* 106:575–582.
- Conley, S. P., Abendroth, L., Elmore, R., Christmas, E. P., & Zarnstorff, M. 2008. Soybean seed yield and composition response to stand reduction at vegetative and reproductive stages. *Agronomy journal*, 100(6), 1666-1669.
- Conley, S. P., Pedersen, P., & Christmas, E. P. 2009. Main-stem node removal effect on soybean seed yield and composition. *Agronomy journal*, 101(1), 120-123.
- Cooper, R. L. 1975. Modifying morphological and physiological characteristics of soybeans to maximize yields. P. 230-236. Ln. L. D. Hill (ed.) *World soybean research: proceedings of the World Soybean Research Conference*. The Interstate Printers & Publishers, Danville.
- Crafts-Brandner, S. J., & Egli, D. B. 1987. Sink Removal and Leaf Senescence in Soybean Cultivar Effects. *Plant Physiology*, 85(3), 662-666.
- Cregan, P.B. and Quigley, C.V. 1997. Simple sequence repeat DNA marker analysis. In: *DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews*. Caetano-Anollés, G & Gresshoff, P.M. (Ed.). New York. EE.UU. pp. 173-185.
- Cregan, P. B., Jarvik, T., Bush, A. L., Shoemaker, R. C., Lark, K. G., Kahler, A. L., Kaya, N., VanToai, T. T., Lohnes, D. G., Chung, J.; Specht, J. E. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:1464-1490.
- Dargahi, H., Tanya, P., Somta, P., Abe, J., & Srinives, P. 2014. Mapping quantitative trait loci for yield-related traits in soybean (*Glycine max* L.). *Breeding science*, 64(4), 282-290.
- De Felipe, M., Gerde, J.A. & Rotundo J.L. 2016. Soybean Genetic Gain in Maturity Groups III to V in Argentina from 1980 to 2015. *Crop Science* 56:1-12.
- Dinkins, R.D., Keim, K. R., Ferno, L. and Edwards, L. H., 2002. Expression of the narrow leaflet gene for yield and agronomic traits in soybean. *J. Hered.* 93(5):346-351.
- Dinneny, J.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Yanofsky, M.F., Weigel D. 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* 131:1101–1110

- Domingo, W. E., 1945. Inheritance of number of seeds per pod and leaflet shape in the soybean. *J. Agric. Res.* 70: 251-268.
- Eathington, S. R., Crosbie, T. M., Edwards, M. D., Reiter, R. S., & Bull, J. K. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Science*, 47 (Supplement_3), S-154.
- Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., & Levitus, G. 2004. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA. Pp 70-85; 86-99; 311-324.
- Egli, D.B. 1988. Plant density and soybean yield. *Crop Sci.* 28: 977-981.
- Egli, D.B. 1998. *Seed biology and the yield of grain crops*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.
- Egli, D.B. 2010. Soybean reproductive sink size and short-term reductions in photosynthesis during flowering and pod set. *Crop science*, 50(5), 1971-1977.
- Egli, D.B., & Zhen-wen, Yu. 1991. Crop Growth Rate and seeds per unit area in soybean. *Crop Sci.* 31:439-442.
- Egli DB, JW Pendleton & DB Peters, 1970. Photosynthetic rate of three soybean communities as related to carbon dioxide levels and solar radiation. *Agron. J.* 62:411-414.
- Egli, D. B., Guffy, R.D., Meckel, L.W. and Legget, J. E. 1985b. The effect of source-sink alterations on soybean seed growth. *Ann. Bot. (London)* 55:395-402.
- Fang, C., Li, W., Li, G., Wang, Z., Zhou, Z., Ma, Y., Shen, Y., Li, C., Wu, Y., Zhu, B., Yang, W., Tian, Z. 2013. Cloning of Ln Gene Through Combined Approach of Map-based Cloning and Association Study in Soybean. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 93-96
- Faris, J.D., K.M. Haen & B.S. Gill, 2000. Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics* 154:823–835.
- Fasoula, V. A., Harris, D. K., & Boerma, H. R. 2004. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil, and seed weight from two soybean populations. *Crop Science*, 44(4), 1218-1225.
- Fehr and Caviness, 1977. Stages of soybean development. Special report 80:1-12. Iowa State University, Ames, Iowa.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introducción al Uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. 1^o Edic. Brasilia: EMBRAPA- CENARGEN.
- Fisher, R.A. & Bhai, Balmukand. 1928. The estimation of linkage from offspring of selfed heterozygotes. *J. Genetics* 20: 79-92.

- Ford, D. M., & Shibles, R. 1988. Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence. *Plant Physiology*, 86(1), 108-111.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Vale, G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317-342.
- Funatsuki, H., Hajika, M., Yamada, T., Suzuki, M., Hagihara, S., Tanaka, Y. & Fujino, K. 2012. Mapping and use of QTLs controlling pod dehiscence in soybean. *Breeding science*, 61(5), 554-558.
- Garcia, A., Calvo, É. S., de Souza Kiihl, R. A., Harada, A., Hiromoto, D. M., & Vieira, L. G. E. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 545.
- Gautier, H., Varlet-Grancher, C., & Baudry, N. (1997). Effects of blue light on the vertical colonization of space by white clover and their consequences for dry matter distribution. *Annals of Botany*, 80(5), 665-671.
- Gerster, G. & Bacigaluppo, S. 2009. Cómo alcanzar altos rendimientos en soja. Para mejorar la producción 42. INTA EEA Oliveros.
- Gibson, L.R., Mullins, R.E. 1996. Influence of day and night temperatures on soybean seed yield. *Crop Sci.* 35, 1636-1642.
- Gitonga, V. W., Koning-Boucoiran, C. F., Verlinden, K., Dolstra, O., Visser, R. G., Maliepaard, C., & Krens, F. A. (2014). Genetic variation, heritability and genotype by environment interaction of morphological traits in a tetraploid rose population. *BMC genetics*, 15(1), 146
- Glazier, A. M., Nadeau, J. H., & Aitman, T. J. 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science*, 298(5602), 2345-2349.
- Gnan, S., Priest, A. & Kover, P.X. 2014. The genetic basis of natural variation in seed size and seed number and their trade-off using *Arabidopsis thaliana* MAGIC lines *Genetics* 198(4), 1751–1758.
- Guang-yu, G., Rui, S., Meng, H., Yong-xin, G., Da-wei, X., Hong-wei, J., & Qing-shan, C. 2011. Quantitative trait locus (QTL) analysis of pod related traits in different environments in soybean. *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11848-11854.
- Guamet, J.J., Nakayama, F. 1984. The effects of long days upon reproductive growth in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) cv. Williams. *Japan. Jour. Crop Sci.* 53(1):35-40.
- Ghiday, T., Amogne, A., Tefera, G., Malede, M. 2017. Heritability, Genetic Advance and Path Coefficient Analysis for Grain Yield and its Component Characters in Soybean

- (*Glycine max* L. Merrill). International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences (IJRSAS) Volume 3, Issue 5, 2017, PP 1-11.
- Green-Tracewicz, E., Page, E. R., & Swanton, C. J. 2011. Shade avoidance in soybean reduces branching and increases plant-to-plant variability in biomass and yield per plant. *Weed Science*, 59, 43–49.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., & Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr Sci*, 80(4), 524-535.
- Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8 : 299-309
- Hansen, W. R., Shibles, R. 1978. Seasonal log of the flowering and podding activity of field-grown soybeans. *Agron. J.* 70, 47-50.
- Hanson, W. D. 1986. Control of dry matter accumulation in soybean seeds. *Crop science*, 26(6), 1195-1200.
- Haile, F.J., L.G. Higley, J.E. Speacht & S.M. Spomer, 1998. Soybean leaf morphology and defoliation tolerance. *Agr. J.* 90:353-362.
- Hartwig, E.E., and C.J. Edwards, Jr, 1970. Effects of morphological characteristics upon seed yield in soybeans. *Agron. J.* 62:64-65.
- Heindl, J.C., Brun, W. 1983. Light and shade effects on abscission and ¹⁴C-photoassimilate partitioning among reproductive structures in soybean. *Plant Physiol.* 73,434-439.
- Heitholt, J.J., D.B. Egli, J.E. Leggett. 1986. Characteristics of reproductive abortion in soybean. *Crop Sci.* 26, 589-595.
- Hicks, D., J. Pendleton, R. Bernard & T. Johnston, 1969. Response of soybean plant types to planting patterns. *Agron. J.* 61:290-3.
- Hiebsch, C.K., Kanemasu, E.T., Nickell, C.D., 1976. Effects of soybean leaflet type on net carbon dioxide exchange, water use, and water-use efficiency. *Can. J. Plant. Sci.* 56: 455-458.
- Hisano, H.; Sato, S.; Isobe.; Sasamoto, S.; Wada, T.; Matsuno, A.; Fujishiro, T.; Yamada, M.; Nakayama, S.; Nakamura, Y.; Watanabe, s.; Harada, K. y Tabata, S. (2007). Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers. *DNA Res.* 14: 271-281.
- Holmes, M.G., Smith, H., 1977. The function of phytochrome in the natural environment. II. The influence of vegetation canopies on the spectral energy distribution of natural daylight. *Photochem. Photobiol.* 25, 539±545.

- Huang, Z.W., Zhao, T.J., Yu, D.Y., Chen, S.Y., Gai, J.Y. 2009 Detection of QTLs of yield related traits in soybean. *Scientia Agricultura Sinica* 42(12):4155–4165.
- Hunt, R., Parsons. E.T. 1981. Plant growth analysis. Users instructions for the stepwise and spline programs. Unit of comparative. Univ. of Sheffield, Sheffield, UK.
- Hwang, T.Y., Sayama, T., Takahashi, M., Takada, Y., Nakamoto, Y., Funatsuki, H., Hisano, H., Sasamoto S, Sato 535 S, Tabata S et al (2009) High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. *536 DNA Res* 16:213–225.
- Hymowitz, T. & Singh, R.J. 1987. Taxonomy and speciation. In: Improvement, production and uses. 2nd ed. J.R. Wilcox (Ed.). Madison. Wisconsin. EE.UU. pp. 23-48.
- Hyten, D.L., Cannon, S.B., Song, Q., Weeks, N., Fickus, E.W., 2010. High throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. *BMC Genomics* 11: 38.
- Ingvarsson, P.K. & Street, N.R., 2011. Association genetics of complex traits in plants. *New Phytologist* 189: 909-922.
- Jain, K. C., and B.B. Singh. 1978. Effect of leaf type, pubescence type and non-nodulating genes on yield and quality characters in soybean. *Indian J. Genet. Pl. Breed.* 38:67-70.
- Jandel Scientific. 1991. Table Curve V. 3.0. User's manual version 3.0 AISN software. Corte Madera, San Rafael, California, USA.
- Jeong, N., Moon, J. K., Kim, H., Kim, C. G., & Jeong, S. C. 2011. Fine genetic mapping of the genomic region controlling leaflet shape and number of seeds per pod in the soybean. *Theoretical & Applied Genetics*, 122(5).
- Jeong, Soon-Chun & Jeong, Namhee & Kim, Minhee & Jeoung Suh, Su & Moon, Jung-Kyung. 2012. Map-based Cloning of the Ln Gene that Controls Leaflet Shape and Number of Seeds per Pod in Soybean. *The Plant Cell*, 1-12.
- Jiang, G. L. 2013. Chapter 3: Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. "Plant Breeding from Laboratories to Fields", book edited by Sven Bode Andersen, ISBN 978-953-51-1090-3.
- Jiang, H.,and Egli D.B. 1993. Shade induced changes in flower and pod number and fruit abscission in soybean. *Agron. J.* 85:221–225.
- Jiang, J., Egli, D.B. 1995. Soybean seed number and crop growth rate during flowering. *Agron. J.* 87:264-267.
- Jiang, W. B., & Lin, W. H. 2013. Brassinosteroid functions in Arabidopsis seed development. *Plant signaling & behavior*, 8(10), e25928.

- Jiang, C., Zeng, Z.B., 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140, 1111-1127.
- Joehanes, R., Nelson, J.C. 2008. QGene 4.0, an extensible Java QTL-analysis platform. *Bioinformatics* 24: 2788-2789
- Johnson, H. W. and Bernard, R. L., 1962. Soybean genetics and breeding. *Adv. Agron.* 14: 149-221.
- Johnston, T. J., Pendleton, J. W., Peters, D. B., & Hicks, D. R. 1969. Influence of supplemental light on apparent photosynthesis, yield, and yield components of soybeans (*Glycine max* L.). *Crop science*, 9(5), 577-581.
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S. M. 2011. The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global J Sci Front Res C Biol Sci*, 11(5), 5-12.
- Jones, N., Ougham, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*. 137: 165-177.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 3(177), 309-334.
- Kantolic, A.G., Slafer, G.A. 2001. Photoperiod sensitivity alter flowering and seed number determination in indeterminate soybean cultivars. *Field Crops Res.* 72:109-118.
- Karasu, A., Oz, M., Göksoy, A. T., & Turan, Z. M. 2009. Genotype by environment interactions, stability, and heritability of seed yield and certain agronomical traits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *African Journal of Biotechnology*, 8(4).
- Karp, A. & Edwards, K.J. 1997. DNA Markers: a global overview. In: *DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews*. Caetano-Anollés, G & Gresshoff, P.M. (Ed.). New York. EE.UU. pp. 1- 12.
- Kasperbauer, M.J. 1987. Far-red light reflection from green leaves and effects on phytochrome-mediated assimilate partitioning under field conditions. *Plant Physiol.* 85, 350-354.
- Kasperbauer, M.J., Kaul, K. 1996. Light quantity and quality effects on source-sink relationships during plant growth and development. In *Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships*. E. Zamski and A.A. Schaffer (ed.) Marcel Decker Inc. p. 421-440.
- Kato, S., Sayama, T., Fujii, K., Yumoto, S., Kono, Y., Hwang, T. Y., & Ishimoto, M. 2014. A major and stable QTL associated with seed weight in soybean across multiple environments and genetic backgrounds. *Theoretical and applied genetics*, 127(6), 1365-1374.

- Kearsey, M.J. & Pooni, H.S. 1996. Genes, genetic markers and maps. In: The genetical analysis of quantitative traits. 1st ed. London. UK. pp. 101-133.
- Kim, H., Lim, H., Choi, Y., Kang, J., Lee, Y., Park, Y., Suh, J., Son, B. 2013. Identification of Quantitative Trait Loci Associated with Number of Pod per Plant, Number of Seed per Plant, Number of Seed per Pod in Soybean (*Glycine max* L.). Journal of Agriculture & Life Science 47(5) pp.1-9.
- Klee, H.J. 2004. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. Plant Physiology, 135(2), 660-667.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. Advances in cellular and molecular biology of plants. Vol. 1. DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. & Vasil, I.K. (Ed.). Dordrecht, The Netherland. Pp. 8-38.
- Kokubun, M., and K. Watanave. 1983. Analysis of yield-determining processes of field-grown soybeans in relation to canopy structure: VIII. Effect of source and sink manipulations during reproductive, growth on yield and yield components. Jpn. J. Crop Sci. 52: 215-219.
- Kosambi, D.D. 1943. The estimation of map units from recombination values. Ann. Eugen. Lond. 12 : 172-175.
- Krisnawati, A., & Adie, M. M. 2017. Variation of leaflet shape from several soybean genotypes and its relation to morphological characters. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 18(1).
- Kruskal, W. H. y W.A. Wallis. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association 47:583-621.
- Kulkarni, K. P., Kim, M., Shannon, J. G. and Lee, J.-D. 2016. Identification of quantitative trait loci controlling soybean seed weight in recombinant inbred lines derived from PI 483463 (*Glycine soja*) × 'Hutcheson' (*G. max*). Plant Breed, 135: 614–620.
- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement. An overview. Biotechnology Advances 17: 143-182.
- Lacadena, J.R. 1988. La recombinación genética en eucariotas: ligamiento y recombinación. 4ta ed. Madrid. España. Pp. 491-524.
- Lander, E. S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M. J.; Lincoln, S. E. y Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174–181.
- Liu, B., 1998. Statical Genomics: Linkage, Mapping and QTL. Analysis CRC Press, Boca Raton.

- Liu, W., Kim, M. Y., Van, K., Lee, Y. H., Li, H., Liu, X., & Lee, S. H. 2011. QTL identification of yield-related traits and their association with flowering and maturity in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14(1), 65-70.
- Litt M. & Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:398-401. 1989.
- Lu, W., Wen, Z., Li, H., Yuan, D., Li, J., Zhang, H., & Du, W. 2013. Identification of the quantitative trait loci (QTL) underlying water soluble protein content in soybean. *Theoretical and applied genetics*, 126(2), 425-433.
- Manav and Arora, R.N. 2017. Genetic variability studies for yield and seedling traits in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Indian Res. J. Genet. & Biotech.* 9(1): 78-110.
- Mandl, F.A. & G.R. Buss. 1981. Comparison of narrow and broad leaflet isolines of soybean. *Crop Sci.* 21:25-27.
- Mansur, L.M., Orf, J.H., Chase, K., Jarvik, T., Cregan, P.B., Lark, K.G. 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36:1327-1336.
- Marchetti, M., Melching, J. and Bromfield, K 1976. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopatology* 66:461-463.
- Masato Orita, Hiroyuki Iwahana, Hiroshi Kanazawa, Kenshi Hayashi & Takao Sekiya 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci.* 86: 2766-2770.
- Melching, J.S., Dowler, W.M., Koogle, D.L. and Royer, M.H., 1989. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods of soybean rust. *Plant Disease* 73: 117-122.
- Metz, G.L., D.E. Green & R.M. Shibles, 1984. Relationships between soybean yield in narrow rows and leaflet canopy, and developmental characters. *Crop Sci.* 24:457-462.
- Mian, M. A. R., Bailey, M. A., Tamulonis, J. P., Shipe, E. R., Carter, T. E., Parrott, W. A., & Boerma, H. R. 1996. Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(7), 1011-1016.
- Michelmore, R., I. Paran & R. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828–9832.

- Molino J, 2011. Estrés térmico por alta temperatura en soja (*Glycine max* (L.) Merr.): análisis de la dinámica de producción y fijación de vainas y su efecto sobre la determinación del rendimiento. Tesis Maestría. Repositorio Institucional Científico y Académico de la Facultad de Agronomía – UBA. Biblioteca Central. 79 pp.
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant physiology*, 147(3), 969-977.
- Morandi, E.N., Casano, L.M., Reggiardo, L.M. 1988. Post-flowering photoperiodic effect on reproductive efficiency and seed growth in soybean. *Field Crops Res.* 18, 227-241.
- Munier-Jolain, N.G., Munier-Jolain, N.M., Roche, R., Ney, B., Duthion, C.. 1998. Seed growth rate in grain legumes I: Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *Journal of Experimental Botany* 49: 1963±1969.
- Myers, R.L., Brun, W.A., Brenner M.L. 1987. Effect of raceme-localized supplemental light on soybean reproductive abscission. *Crop Sci.* 27: 273-277.
- Nico, M., Mantese, A. I., Miralles, D. J., & Kantolic, A. G. (2015). Soybean fruit development and set at the node level under combined photoperiod and radiation conditions. *Journal of experimental botany*, 67(1), 365-377.
- Nyquist, W. E., & Baker, R. J. 1991. Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical reviews in plant sciences*, 10(3), 235-322.
- Ohno C.K., Reddy, G.V., Heisler M.G.B., Meyerowitz, E.M. 2004. The Arabidopsis JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* 131:1111–1122.
- Palmer, R.G. & Hedges, B.R. 1993. Linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr.) In: Genetic maps: Locus maps of complex genomes. O'Brien, S. J. (Ed.). New York. EE.UU. pp. 6.139-6.148.
- Palomeque, L., Liu, L. J., Li, W., Hedges, B. R., Cober, E. R., Smid, M. P., & Rajcan, I. 2010. Validation of mega-environment universal and specific QTL associated with seed yield and agronomic traits in soybeans. *Theoretical and applied genetics*, 120(5), 997-1003.
- Pascale, A. J. y Demario, E.A. 1996. Evolución del cultivo de la soja en Argentina. *Oleaginosos* 5 (15):5-10.
- Paterson, A. H., Tanksley, S. D., & Sorrells, M. E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in agronomy*, 46, 39-90.
- Pedersen, P., y Lauer, J. G. 2004. Response of soybean yield components to management system and planting date. *Agronomy Journal*, 96(5), 1372-1381.

- Pierik, R., Cuppens, M. L., Voeselek, L. A., & Visser, E. J. 2004. Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiology*, 136(2), 2928-2936.
- Poland JA, Rife TW, 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *Plant Genome* 5: 92–102.
- Porter, C. 2000. Inheritance of the Gene(s) Controlling Leaflet Shape in Soybean. MSc. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, VA.
- Qijian Song, Jerry Jenkins, Gaofeng Jia, David L. Hyten, Vince Pantalone Scott A. Jackson, Jeremy Schmutz and Perry B. Cregan. 2016. Construction of high resolution genetic linkage maps to improve the soybean genome sequence assembly Glyma1.01. *Genomics* (2016) 17:33.
- Quarrie S., Lazic-jancic V., Kovacevic D., Steed A., Pekic S. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J Exp Bot* 50:1299–1306.
- Quijano A, 2014. Regulación fotomorfogénica del número de estructuras reproductivas en canopeos de soja. Tesis Doctoral. Repositorio Institucional Científico y Académico de la Facultad de Agronomía – UBA. Biblioteca Central. 218 pp.
- Quijano A., Morandi E.N. 2007. ¿Son los asimilados el único factor limitante en el establecimiento de los frutos en soja? Workshop Internacional: Eco Fisiología Vegetal aplicada al estudio de la determinación del rendimiento y la calidad de los cultivos de granos. Primer encuentro Red Raíces de Ecofisiología, SECyT. Mar del Plata, argentina. Libro de Resúmenes, p. 30-31.
- Quijano A. & E.N. Morandi, 2011. Post-flowering leaflet removals increase pod initiation in soybean canopies. *Field Crops Res.*120:151-160.
- Quijano, A. Martignone, R.A, Morandi E.N., Bodrero M.L. 1998. Relación entre el número de semillas, la tasa de crecimiento de cultivo y rendimiento en soja. *Actas XXII Reun. Arg. de Fisiología Vegetal*, Mar del Plata. Pp. 170-171.
- Ragin, B., Richard, B., Willsheana, C., Stella, K.K., Khalid, M., Masum, A., Kassem M.A. 2012. Genetic Analysis of Yield Components in the PI 438489B by 'Hamilton' Recombinant Inbred Line (RIL) Population of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J Agric Sci* 4:98–105.
- Ray, J. D., Hinson, K., Mankono, J., & Malo, M. F. 1995. Genetic control of a long-juvenile trait in soybean. *Crop Science*, 35(4), 1001-1006.
- Reyna, N., Sneller, C.H. 2001. Evaluation of marker-assisted introgression of yield QTL alleles into adapted soybean. *Crop Sci* 41:1317–1321

- Rotzler, D., Stamp, P., Betris, C., De Groote, J., Moullet, O. and Schori, A. 2009. Agronomische Bedeutung lanzett-förmiger Blätter bei der Soja. *AGRARForschung* 16(11:12): 472-477.
- Rousseaux, M.C., Hall, A.J., Sanchez, R.A., 1996. Far-red enrichment and photosynthetically active radiation influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiol. Plant.* 96, 217±224.
- Sadras, V. O. 2007. Evolutionary aspects of the trade-off between seed size and number in crops. *Field Crops Research*, 100(2), 125-138.
- Salas, P., Oyarzo-Llaipen, J.C., Wang, D., Chase, K., Mansur, L. 2006. Genetic mapping of seed shape in three populations of recombinant inbred lines of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor Appl Genet* 113:1459–1466.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. (Eds). *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. New York. EEUU.
- Sánchez, R. A., Casal, J. J., Ballaré, C. L., & Scopel, A. L. 1993. Plant responses to canopy density mediated by photomorphogenic processes. *International Crop Science I*, (internationalcr), 779-786.
- SAS University Edition. 2017. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sawada, S. 1988. Inheritance of leaflet shape in soybeans. *Soybean Genet. Newsl.* 15:61-65.
- Sayama, T., Tanabata, t., Saruta, M., Yamada, T., Anai, T., Kaga, A., Ishimoto, M. 2017. Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the *Ln* gene in induced soybean mutants. *Breeding Science* 67: 363–369.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W. & Xu, D. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *nature*, 463(7278), 178-183.
- Schou, J. B., Jeffers, D. L., & Streeter, J. G. 1978. Effects of reflectors, black boards, or shades applied at different stages of plant development on yield of soybeans. *Crop Science*, 18(1), 29-34.
- Schuster, I. & Damiao-Cruz, C. 2004. *Estadística genómica aplicada a poblaciones derivadas de cruzamientos controlados.* Universidad Federal de Vicouza (UFV) Editora.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Xu, Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), 16-17.
- Shagai-Marooof M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard, 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.

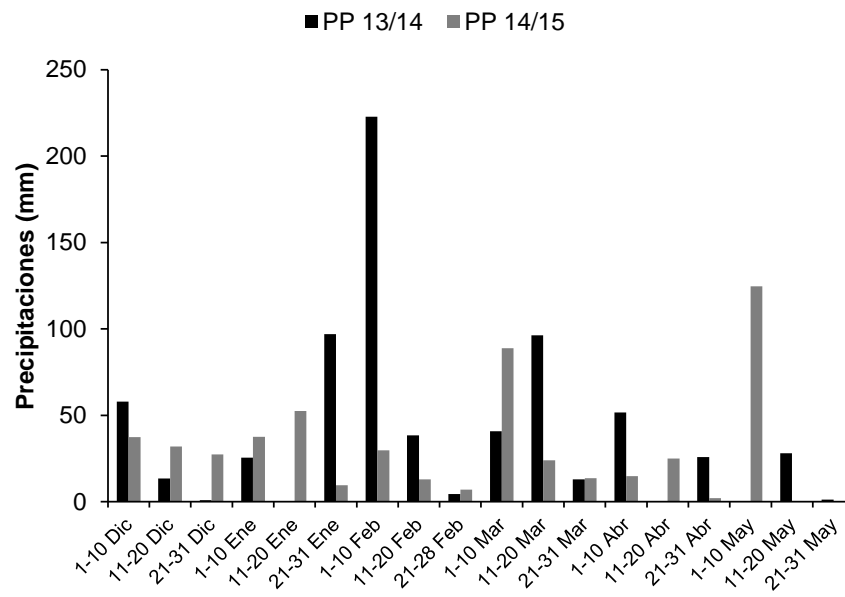
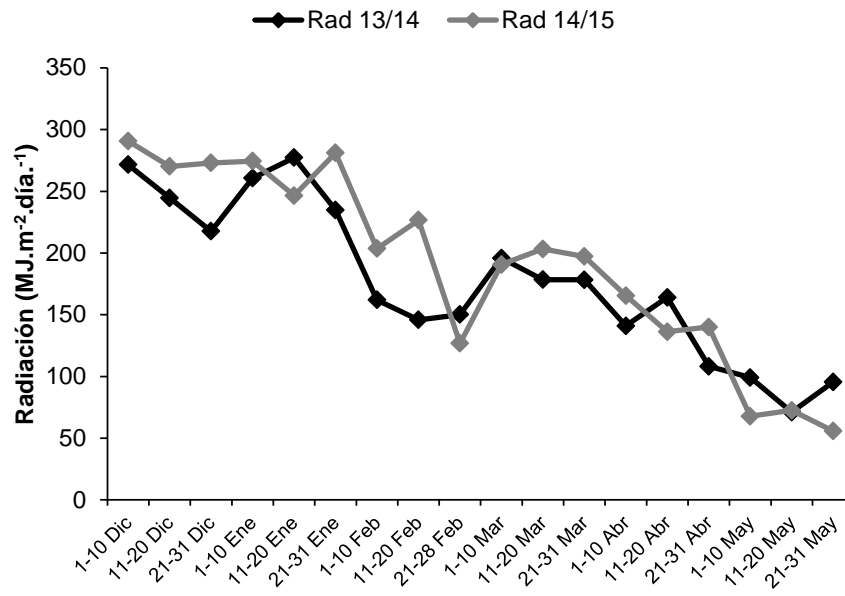
- Shashidhar, H.E., Vinod, M.S., Sudhir, N., Sharma, G.V., Krishnamurthy, K. 2005. Markers linked to grain yield using bulked segregant analysis approach in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Genet Newsl* 22:69–71.
- Shapiro, S. & Wilk, M. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3): 591-611.
- Shibles, R.M., I.C. Anderson, and A.H. Gibson. 1975. Soybean. p. 151-190. *In*. L.T. Evans (ed.) *Crop Physiology*. Cambridge Univ. Press, London.
- Shibles, R.M, y Weber, C.R. 1965. Leaf area, solar radiation interception and dry matter production by soybeans. *Crop Sci.* 5:575-577.
- Sinclair, T. R., & Muchow, R. C. 1999. Radiation use efficiency. *Advances in agronomy*, 65, 215-265.
- Smith H, 1986. The perception of light quality, pp. 187-217, *In*: Kendrick RE & Kronenberg GHM (eds). *Photomorphogenesis in plants*. Marthinus Nihoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Smith, H. 2000. Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature*, 407, 585–591.
- Snedecor, G. 1964. *Métodos Estadísticos*. P 631. Edición N° 5. Compañía Editorial, México.
- Spencer, M., Pantalone, V., Meyer, E., Landau-Ellis, D., & Hyten, D. 2003. Mapping the Fas locus controlling stearic acid content in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4), 615-619.
- Song, Q. J., Marek, L. F., Shoemaker, R. C., Lark, K. G., Concibido, V. C., Delannay, X., Specht, J.E. & Cregan, P. B. 2004. A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1), 122-128.
- Song Q., Jia, G., Zhu, Y., Grant, D., Nelson, R.T., Hwang, E.Y. & Cregan, P.B. 2010. Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1. 0) in soybean. *Crop Science*, 50(5), 1950-1960.
- Song, Q., Jenkins, J., Jia, G., Hyten, D.L., Pantalone, V., Jackson, S.A., Schmutz, J., Cregan, P.B. 2016. Construction of high resolution genetic linkage maps to improve the soybean genome sequence assembly Glyma1.01. *BMC Genomics* 17:33
- Soybase. [http:// www.soybase.org/search/qlist.php](http://www.soybase.org/search/qlist.php).
- Srinivasan, V., Kumar, P., & Long, S. P. 2017. Decreasing, not increasing, leaf area will raise crop yields under global atmospheric change. *Global change biology*, 23(4), 1626-1635.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3:739–744.

- Suh-Sugkee, Cho-Youngkoo, Park-Hoki and Scott, R.A., 2000. Gene action and heritability of leaf and reproductive characteristics in soybean. *Breed. Sci.* 50(1): 45-51.
- Sujata, B., Basavaraja, G.T., Salimath, P.M. 2011. Evaluation of narrow leaflet genotypes and genetic variability in segregating generation of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Electronic J Plant Breed* 2: 124-131.
- Sung, F.J.M. & J.J. Chen, 1989. Changes in photosynthesis and other chloroplast traits in lanceolate leaflet isolate of soybean. *Plant Physiol.* 90:773-777.
- Suwignyo, R. A., Nose, A., Kawamitsu, Y., Tsuchiya, M., & Wasano, K. 1995. Effects of manipulations of source and sink on the carbon exchange rate and some enzymes of sucrose metabolism in leaves of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant and cell physiology*, 36(8), 1439-1446.
- Swank, J.C., D.B. Egli, and T.W. Pfeiffer. 1987. Seed growth characteristics of soybean genotypes differing in duration of seed fill. *Crop Sci.* 27:85–89.
- Takahashi, N., 1934. Linkage relation between the genes for the form of leaves and the number of seeds per pod of soybean. *Jpn. J. Genet.* 9:208-225.
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H.; Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics.* 27:205-233.
- Tatsuya, I., Shizen, O., Mineo, S., Tomoaki, M., Masao, I., Keisuke, K., Hideyuki, F. 2009. A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theor Appl Genet* 118:1477–1488.
- Tilman, D., & Clark, M. 2015. Food, Agriculture & the environment: Can we feed the world & save the Earth?. *Daedalus*, 144(4), 8-23.
- Toyota, M., Maitree, L., & Chomsang, K. 2017. Changes in radiation interception and R: FR over time and with canopy depth of two soybean cultivars with different branching characteristics. *Plant Production Science*, 20(2), 205-214.
- Van Doorn, W. G. 2002. Effect of ethylene on flower abscission: a survey. *Annals of botany*, 89(6), 689-693.
- Van Roekel, R. J., Purcell, L. C., & Salmerón, M. 2015. Physiological and management factors contributing to soybean potential yield. *Field Crops Research*, 182, 86-97.
- Vega, C. R., Andrade, F. H., Sadras, V. O., Uhart, S. A., & Valentinuz, O. R. 2001. Seed number as a function of growth. A comparative study in soybean, sunflower, and maize. *Crop Science*, 41(3), 748-754.
- Venuprasad, R., Dalid, C.O., Del Valle, M., Zhao, D., Espiritu, M., Sta Cruz, M.T., Amante, M., Kumar, A., Atlin, G.N. 2009. Identification and characterization of large effect

- quantitative trait loci for grain yield under lowland drought stress in rice using bulk-segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 120, 177–190.
- Vikram, P., Swamy, M., Dixit, S., Ahmed, H., Sta Cruz, M.T., Singh, A., Ye, G., Kumar, A. 2012. Bulk segregant analysis: “An effective approach for mapping consistent-effect drought grain yield QTLs in rice”. *Field Crops Research* 134: 185–192.
- Vinod, K. K. 2006. Genome mapping in plant populations. Proceedings of training programme on “Modern approaches in Plant Genetics resources-collection, conservation and utilization”, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 402-414.
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93: 77–78.
- Vos P., Hogers M., Bleeker M., Rijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Wallace, J.G. & Mittchel, S.E., 2017. Genotyping-by-sequencing. *Current Protocols in Plant Biology*, 2: 64-77.
- Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.B., 2011. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, G. & A.H. Paterson, 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor Appl Genet* 88: 355–361.
- Wang, X., Jiang, GL., Green, M., Scott, R., Hyten, D., Cregan. 2014. Identification and validation of quantitative trait loci for seed yield, oil and protein contents in two recombinant inbred line populations of soybean. *Mol Genet Genomics* (2014) 289: 935.
- Weiss, M.G. 1970. Genetic linkage in soybeans. Linkage group IV. *Crop Sci* 10:368–370.
- Wells R, JW Burton & TC Kilen, 1993. Soybean growth and Light Interception: Response to differing leaf and stem morphology. *Crop Sc.* 33:520-524.
- Welsh J. & McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Wiebold, W. J., Ashley, D. A., & Boerma, H. R. 1981. Reproductive abscission levels and patterns for eleven determinate soybean cultivars. *Agronomy Journal*, 73(1), 43-46.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.* 18 (22): 6531-6535.

- Wyman, A.R., & White, R.A. 1980. Highly Polymorphic Locus in Human DNA. *Proc Natl Acad Sci Nov*;77(11):6754-8.
- Xu, Y., Li, H.N., Li, G.J., Wang, X., Cheng, L.G., Zhang, Y.M. 2011. Mapping quantitative trait loci for seed size traits in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor Appl Genet* 122:581–594.
- Yamanaka, N., Hossain, M.M., Yamaoka, Y. 2015. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in Chinese and Japanese soybean lines, Xiao Jing Huang, Himeshirazu, and Iyodaizu B. *Euphytica* 205 (2) 311-324.
- Yang, Z., Xin, D., Liu, C., Jiang, H., Han, X., Sun, Y. & Chen, Q. 2013. Identification of QTLs for seed and pod traits in soybean and analysis for additive effects and epistatic effects of QTLs among multiple environments. *Molecular genetics and genomics*, 288(12), 651.
- Yiwu Chen and Randall L. Nelson, 2004. Evaluation and classification of leaflet shape and size in wild soybean. *Crop. Sci.* 44: 671-677.
- You, M. G., Liu, Y. B. and Zhou, T. J., 1995. Effects of leaf shape on seed yield and its components in soybeans. *Soybean Genet. Newslett.* 22:66-70.
- Yuan, J., Njiti, V. N., Meksem, K., Iqbal, M. J., Triwitayakorn, K., Kassem, M. A. & Lightfoot, D. A. 2002. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. *Crop science*, 42(1), 271-277.
- Zeng, Z. B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136(4), 1457-1468.
- Zhang, W.K., Wang, Y.J., Luo, G.Z., Zhang, J.S., He, C.Y., Wu, X.L., Gai, J.Y., Chen, S.Y. 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor Appl Genet* 108:1131–1139.
- Zhang, D., Cheng, H., Wang, H., Zhang, H.Y., Liu, C.Y., Yu, D.Y. 2010. Identification of genomic regions determining flower and pod numbers development in soybean (*Glycine max* L.). *J Genet Genomics* 37:545–556.
- Zhang, G., Chen, L., Xiao, G., Xiao, Y., Chen, X. and Zhang, S. 2009. Bulk Segregant Analysis to Detect QTL Related to Heat Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) using SSR Markers. *Agricultural Sciences in China* 8(4): 482-487.
- Zhu, B. G., & Sun, Y. R. 2006. Inheritance of the four-seeded-pod trait in a soybean mutant and marker-assisted selection for this trait. *Plant breeding*, 125(4), 405-407.

ANEXO



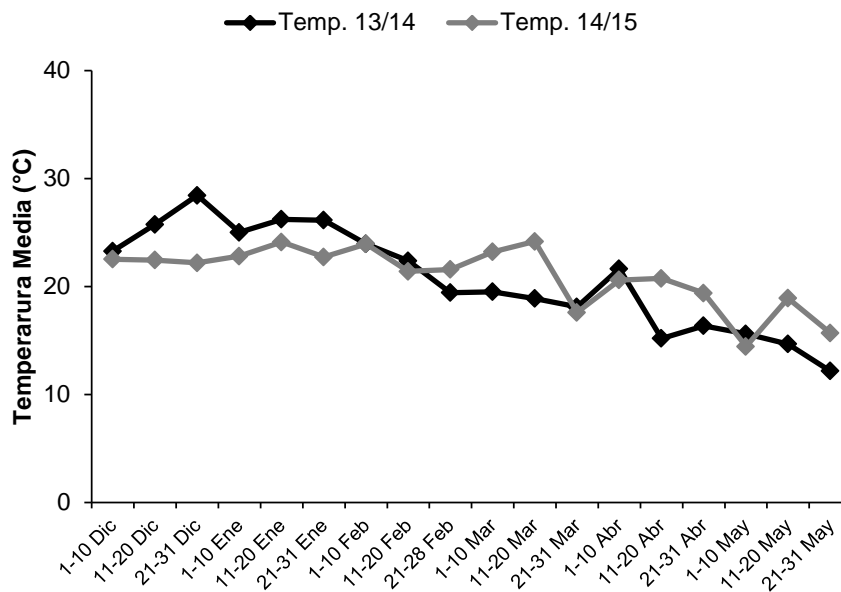


Figura suplementaria 1. Radiación incidente (Rad: MJ.m⁻².día⁻¹), Precipitaciones (PP: mm) y Temperatura Media (Temp, °C) para las estaciones de crecimiento 2013/14 y 2014/15. Los puntos (radiación y temperatura) corresponden a promedios decádicos y las barras a las precipitaciones acumuladas para cada período decádico.

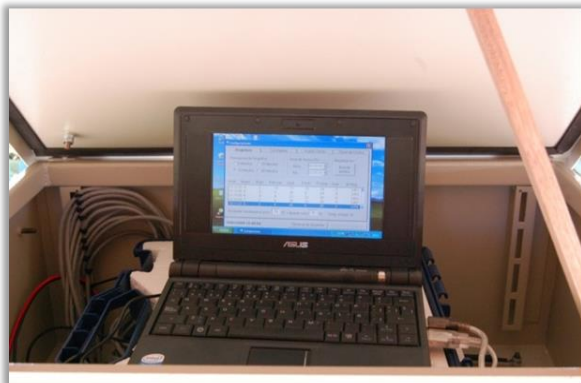


Figura suplementaria 2. Equipo desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, en colaboración con la Empresa Consultar SRL, Rosario, Argentina, utilizado para medir RFA (rango: 400-700 nm), R (650-670 nm) y RL (720-740 nm).

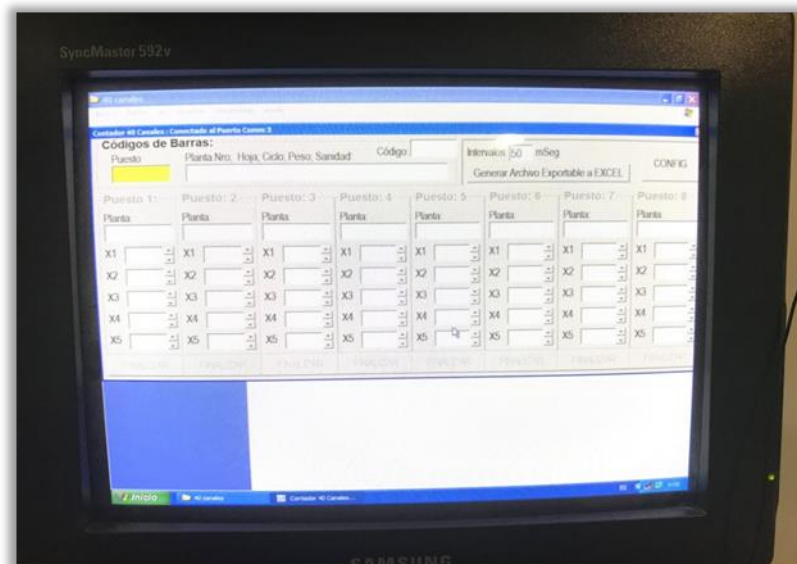


Figura suplementaria 3. Dispositivo *ad hoc* utilizado para el recuento de vainas por categoría.

Tabla suplementaria 1. Marcadores microsatélites utilizados para la construcción de los grupos de ligamiento molecular destinados al mapeo genético de los caracteres forma de hoja y número promedio de semillas por vaina. Se muestra el grupo de ligamiento molecular al que pertenece cada marcador, el código público correspondiente y los primers utilizados para su amplificación.

GLM ¹	MM-SSR ²	Forward primer	Reverse primer
F	Satt252	GCGAATTTGGATTAATTAATTTATG	GCGCTCGGTCTCTCAAATAAGGTCTC
F	Satt144	CGTCGCCATCACTATGAGAA	CCATCTTGAGCAGAGTTTGAAGTT
F	Sat_234	GCGATGCGTTTAATAAGTTTTGAAAAATGCC	GCGGAAACCATCCTTATATGTCAATTGCTCA
F	Satt334	GCGTTAAGAATGCATTTATGTTTAGTC	GCGAGTTTTTGGTTGGATTGAGTTG
F	Satt149	TTGCACATTCTTTTTGGTAAACAGTCATAA	GTTGGAGGCCATAGTCACATTAATCTTAGA
F	Satt030	AAAAAGTGAACCAAGCC	TCTTAAATCTTATGTTGATGC
F	Sat_298	GCGCGTCGAAGCAAAAATTA	GCGGCGAAACCCACAAAGCATA
F	Sat_262	GCGTTTGCAATTAGGGATTATCTAGTTTATGA	GCGGGTTAGAACATTCTTAGTTAGCTCCAG
L	Sat_113	GGAGCATAACAGCCTTAAGAGAT	TGGGCATCAAACTAAGAAAA
L	Sct_010	TCCAAAAGCATTGAG	TATGCACGGAAGAGGA
L	Satt284	TGGGCTAGGAGTGACCAC	GGTCACTCACTCACCATCA
L	Satt076	TAATCGAGATTTAATAGAAAACA	TGGATGGACATTTTCAG
L	Satt448	GCGCTAAGGGCAATTTTATCAA	GCGCAGCCTGTTGAGTTTTCTTTTGTG
L	Gmes0630	AGAAAGCAGACCTCAAAGCC	AGGATCAGAAGCAAAGGGGT
L	B17D07	TTGTTTTGCAGTTGCTTCCA	TCCTATTTTTCACACATTTTCAG
L	Satt166	TTGCACAGTTGATTTTTGTTT	GCATCGAATTTCTGGATTTAC
L	Satt527	GCGGTTACATCTTGCAACTAAATTAAC	GCGGAATTTTGCACATAAATTAATAACT
L	Satt561	GCGGACGAATTTTCCAGA	GCGGGCAACAATATTTGAATCTA
L	GMES1723	TCTCTTTTCACGGTGGCTTC	AAGGAGTGGTTGTGGGTTTG
I	Satt354	GCGAAAATGGACACCAAAAGTAGTTA	GCGATGCACATCAATTAGAATATACAA
I	BARCSOYSSR_20_0845	CATGGTATTGCAAATGCACC	AAGGCTGAATCCGTTGAGTC
I	Sat_418	GCGTCATGTCGCTACTAA	GCGTGGCTACACAACCTTTT
I	Sat_268	GCGTGCAACATATGACACCATAAAT	GCGTGAGGAGGTTCAAAAATAACAT
I	BARCSOYSSR_20_0842	TTGCAAACTATGCGCATTTA	CCTGTGTGATTTGATCCCCT
I	Ln_at006	AAATGATAATCGAATTGCT	TTCAAAAACATTTTCCTTTA
I	Ln_at008	AGTTGTGAAGTGTGTTCAAT	TAAATGAAAATTTTCGGATAA
I	BARCSOYSSR_20_0829	AAAAATGAAGCCGCTAGTGC	TCTTTGAAATAAATGGGGAAAA
I	BARCSOYSSR_20_0818	CAAACCTTTCACCAAACGAGC	CTGCTGATGGTGCTTGA
I	BARCSOYSSR_20_0847	TTTCTTGGCAGGCTCAATCT	CGCATTATGTTCCAGTTT
I	GMES0205	GAGGATCGGGTAACGAATCA	TAATTCAGCGGAAAGAAGCC
I	Satt292	GCGGAATTAGAATCCAGTAAAGA	GCGAGCCAACATTGAAAAGT
I	Ln_at004	AAAAGAATATATCTGTGATGA	TATTTATGCTGTTTCATAAT
I	H45B01	TTTTAGATACGTTTATACGCTTATGG	GCAACTTGATTTCTCTCTCTCA

¹GLM: Grupo de ligamiento molecular.

²MM-SSR: Single Sequence Repeat, "Repeticiones de secuencia simple". Marcadores Microsatélites.

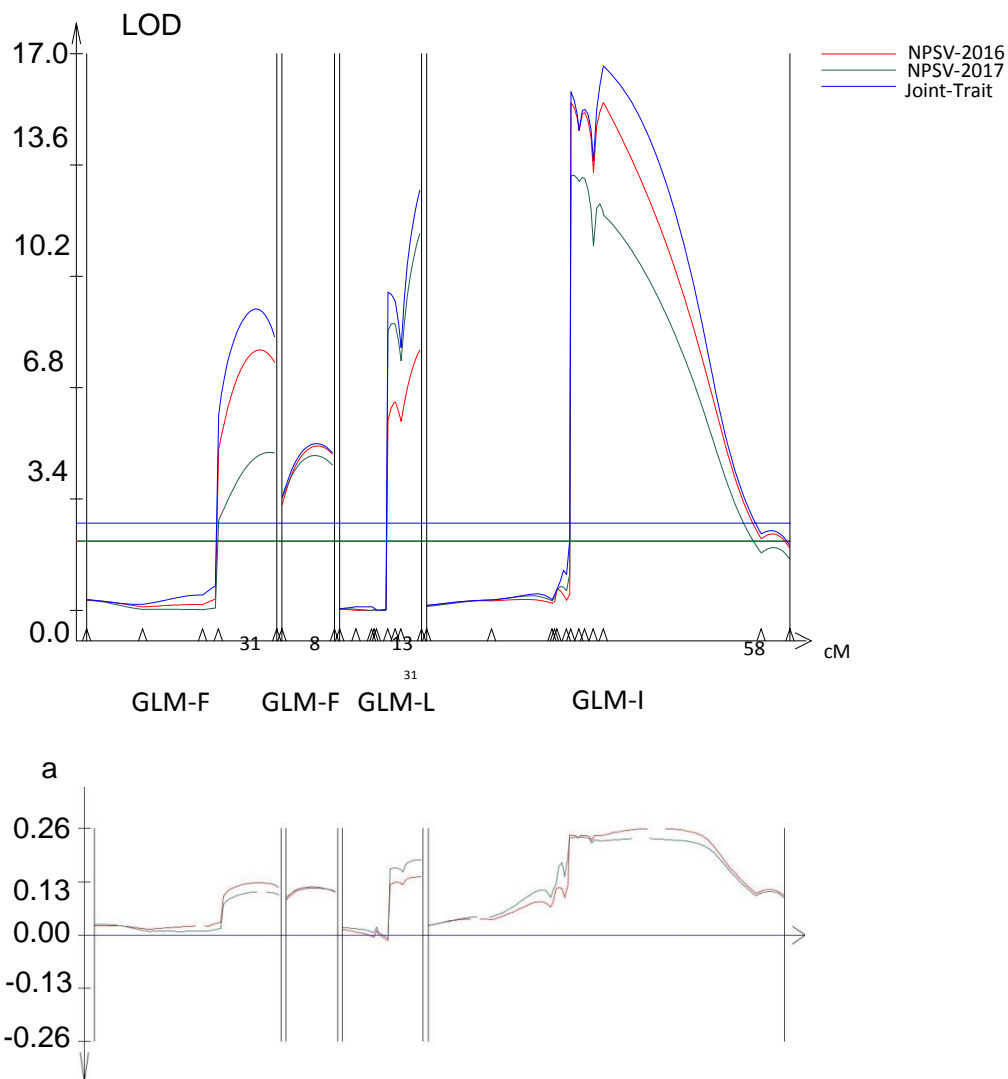


Figura suplementaria 4. Gráfico construido a partir de los valores de LOD (eje de ordenadas) en función de la posición genética expresada en cM (eje de abscisas) de las cuatro regiones en las que se detectó la presencia de un QTL asociado al carácter número promedio de semillas por vaina a través del mapeo multicarácter por intervalos compuestos (grupos de ligamiento, GLM, F, L, I). En rojo se muestra el análisis para la campaña 2015/16, en negro para la campaña 2016/17 y en azul las dos campañas juntas (“joint trait”). El valor de LOD crítico se indica para cada caso con una línea horizontal del color correspondiente para cada análisis. Debajo se muestran los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.