



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

**BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA A LA CANCROSIS DEL
TALLO DE SOJA CAUSADA POR *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora***

MSC. LIC. ALEJANDRA M. PERUZZO

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTORA: DRA. ROSANNA NORA PIOLI

CO- DIRECTOR: DR. LEONARDO DANIEL PLOPER

2018

**BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA A LA CANCROSIS DEL
TALLO DE SOJA CAUSADA POR *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora***

Alejandra María Peruzzo

Licenciada en Biotecnología – 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 la Facultad de Ciencias Agrarias, durante el período comprendido entre abril de 2013 hasta diciembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Rosanna Nora Pioli.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma del Co - Director

Defendida:de 20__.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi Directora de tesis, la ***Dra. Rosanna Pioli***, por el tiempo que dedica a esta hermosa profesión y a la formación de personas idóneas y comprometidas en el avance de la ciencia. Agradezco su dedicación, esfuerzo, paciencia y compromiso en mi formación profesional, que trasciende los cinco años de realización de esta tesis.

Mi gratitud por su disposición y profesionalidad a mi co-Director, el ***Dr. Daniel Ploper***, quien me ha brindado su tiempo y me ha aconsejado de manera de sortear los obstáculos que surgieron durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al ***Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*** (CONICET) por el otorgamiento de una Beca Interna Doctoral y a la ***Facultad de Ciencias Agrarias - Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario*** (IICAR, UNR-CONICET), quienes brindaron las instalaciones en las cuales se desarrolló este proyecto de tesis. Es valedero agradecer además el soporte financiero logrado a través de la ***Bolsa de Comercio de Rosario*** y la provisión de insumos certificados y recursos para promover mi formación en técnicas biotecnológicas innovadoras por parte de ***Don Mario Seeds*** (Lodrina Brasil).

Educar a una persona no es hacerle aprender algo que no sabía, sino hacer de él alguien que no existía. Muchas gracias por todo a la ***cátedra de Fitopatología***, tanto a quienes aún comparten este espacio como a aquellos que ya no están. Le agradezco especialmente a mi compa!

Muchas gracias a la ***cátedra de Botánica*** por el tiempo compartido, el cariño y la amistad, especialmente a ***Marta Bianchi*** por sus clases de Botánica a cielo abierto.

Estoy realmente agradecida al personal de campo de la Facultad de Ciencias Agrarias, ***Hernán y Jorge***, por su trabajo dedicado. También quiero agradecer a las secretarias de la Escuela de Posgrado, ***Micaela y Brenda***, por su asistencia constante en cada etapa de mi formación.

Expreso además mi reconocimiento especial al ***Dr. Guillermo Pratta***, al ***Dr. Carlos Gosparini***, al ***Dr. Carlos Cairo***, a la ***Ing. Agr. Bibiana Ferrari*** y al ***Dr. Gaspar Malone*** por su predisposición permanente a dar respuesta a las consultas interdisciplinarias, colaborar

activamente en resolver temas técnico-logísticos surgidos durante el desarrollo de la tesis y promover mi formación académica en un marco de respeto recíproco.

Gracias a cada persona que en mi lugar de trabajo me brindaron su apoyo y amistad.

Gracias a mi familia, los *Peruzzo-Zanella* y los *Reyes-Boscaglia*, quienes me acompañaron constantemente en el cuidado de las plantas. Tengo que agradecerle en especial a vos, mamá!

Gracias *Lucio* por estar siempre conmigo, apoyarme en mi crecimiento profesional y personal, ayudándome incondicionalmente en cada etapa. Gracias por tu enorme sacrificio sin esperar nada a cambio.

Gracias a mi hija *Lucrecia* por darle un significado especial al último ensayo de esta tesis. Aunque aún no puedas comprenderlo, te agradezco por tu infinita paciencia en esta etapa de escritura del manuscrito.

DEDICATORIAS

“Pues habían vivido juntos lo bastante para darse cuenta de que el amor era el amor en cualquier tiempo y en cualquier parte, pero tanto más denso cuanto más cerca de la muerte”

Gabriel García Márquez

*Dedicada a Lucio, quien hace grande mi corazón,
y a mi hija Lucrecia, quien lo conoce por dentro.*

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Publicaciones:

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. Identification and inheritance of an *Rdc* gene conferring resistance to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). Enviada al momento de presentación de tesis.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Malone G., Ferrari B., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. Molecular validation of heterozygous F₁ individuals obtained from crosses between parents of differential reaction to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). Enviada al momento de presentación de tesis.

Presentaciones a Congresos:

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Malone G., Ferrari B., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. Análisis del fondo genético de genotipos de soja portadores de Resistencia a CTS-*Dpc* a través de SNP. In: Jornada Regional del Litoral, Asociación Argentina de Genética. Rafaela, Argentina.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Cabodevila V., Cacchiarelli P., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. Búsqueda e identificación de resistencia a la cancrrosis del tallo de soja causada por *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. 1° Taller Nacional de enfermedades en cultivos extensivos. Tema: cancro por *Diaporthe/Phomopsis* en soja y girasol. Diagnóstico y manejo. Disertación. Pergamino, Argentina.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. First report on the identification and inheritance of an *Rdc* gene conferring resistance to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). World Soybean Research Conference Ten, Savannah, Georgia, USA.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017. Segregación diferencial de la resistencia a cancro del tallo de soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) en cruzamientos que comparten el mismo progenitor resistente. IV Jornada Uruguay de Fitopatología – II Jornada Uruguay de Protección Vegetal, Montevideo, Uruguay.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017. First report on the identification and inheritance of an *Rdc* gene conferring resistance to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). IV Jornada Uruguaya de Fitopatología – II Jornada Uruguaya de Protección Vegetal, Montevideo, Uruguay.

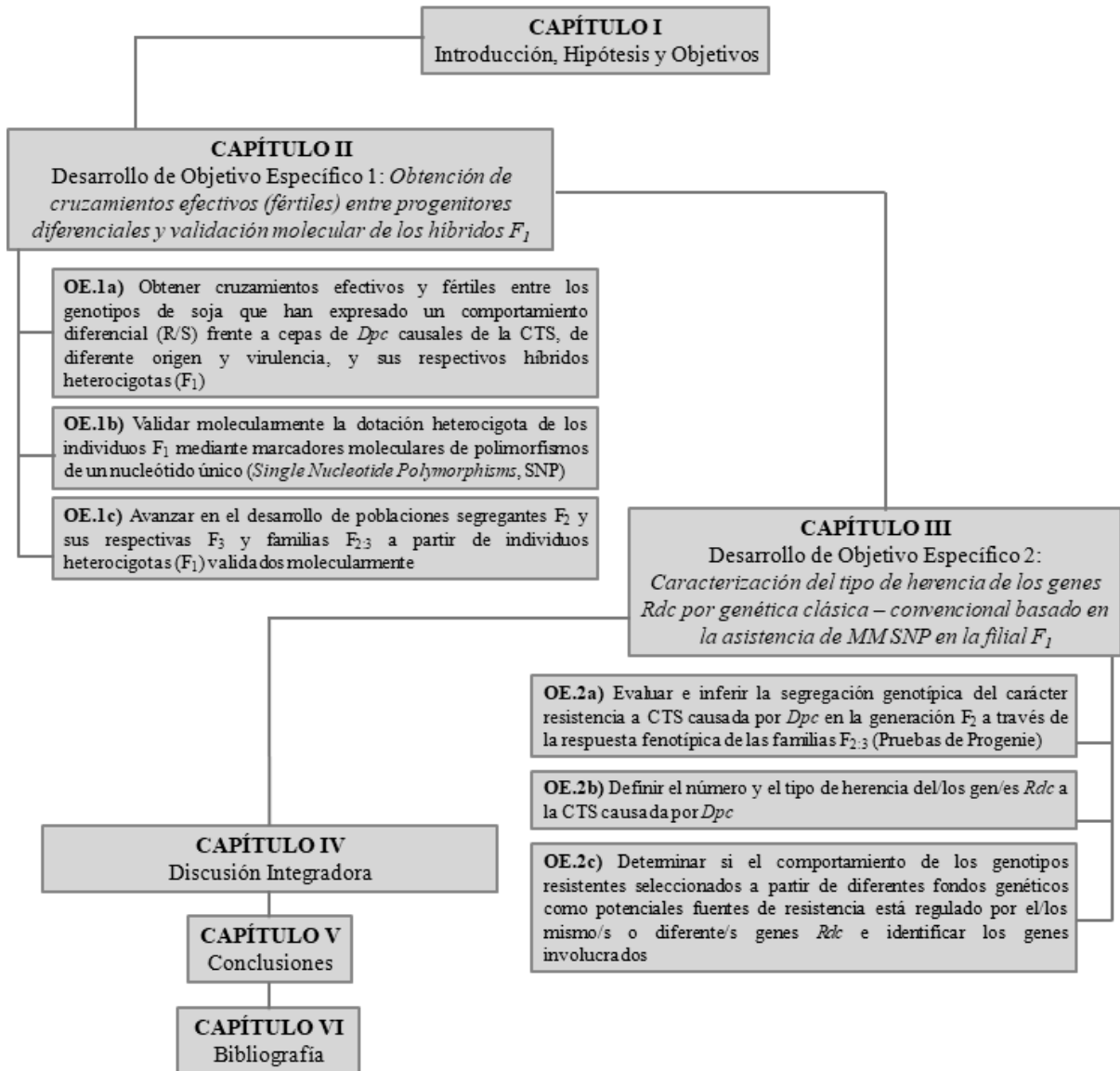
Peruzzo A.M., Hernández F.E., López Achaval P., Pratta G.R., Cairo C., Gosparini C., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017. Avances y logros en la búsqueda de resistencia a la cancrrosis del tallo de soja causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. XI Jornada de Ciencia y Tecnología. Rosario, Argentina.

Peruzzo A.M., Hernández F.E., Lima Brito Junior S., Malone G., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017. Marcadores moleculares de tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) para la validación de híbridos en la F₁ de cruzamientos para estudios de resistencia a la cancrrosis del tallo de la soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina.

Peruzzo A., Ploper L.D., Pioli R.N. 2016. Exposición de avance de tesis doctoral en Taller Agronómico de Problemas Específicos sobre Patología Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Peruzzo A., Pioli R.N., Cairo C., Pratta G., Ploper L.D. 2015. Obtención de la primera generación filial entre cultivares de soja para la identificación de genes de resistencia a *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. XVII Congreso y XXXV Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina.

ORGANIGRAMA



ÍNDICE

Agradecimientos	3
Dedicatorias	5
Publicaciones y presentaciones a congresos	6
Organigrama	8
Índice	9
Abreviaturas y símbolos	12
Resumen	13
Abstract	15
CAPÍTULO I. Introducción, Hipótesis y Objetivos	17
Introducción	18
Hipótesis de trabajo	24
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos	25
CAPÍTULO II. Obtención de cruzamientos efectivos (fértiles) entre progenitores diferenciales y validación molecular de los híbridos F₁	26
Actividades desarrolladas para cumplir el Objetivo Específico 1a.....	27
IIa. Materiales y Métodos	27
IIa.1. Selección del germoplasma fúngico y vegetal	27
IIa.1.1. Selección del germoplasma fúngico disponible	27
IIa.1.2. Selección del germoplasma vegetal disponible.....	29
IIa.2. Cruzamientos entre genotipos de soja y obtención de la primera generación filial (F ₁).....	31
IIa. Resultados.....	36
IIa.1. Cruzamientos entre genotipos de soja y obtención de la primera generación filial (F ₁).....	36
IIa. Discusión Parcial.....	46
Actividades desarrolladas para cumplir el Objetivo Específico 1b	50
IIb. Materiales y Métodos	50

Iib.1. Validación molecular de la dotación genética de los individuos F_1 en comparación con sus respectivos progenitores, mediante cebadores SNP.....	50
Iib. Resultados	55
Iib.1. Validación molecular de la dotación genética de los individuos F_1 en comparación con sus respectivos progenitores, mediante cebadores SNP.....	55
Iib.2. Presentación y análisis de datos del programa PHERAstar Plus SNP.....	63
Iib.3. Criterios de análisis para determinar que un individuo es heterocigota e híbrido de los progenitores usados en el cruzamiento.....	66
Iib. Discusión Parcial	85
Actividades desarrolladas para cumplir el Objetivo Específico 1c	88
Iic. Materiales y Métodos	88
Iic.1. Obtención de semillas de la segunda generación filial (F_2) a partir de individuos F_1	88
Iic.2. Obtención de semillas de la tercera generación filial (F_3) a partir de individuos F_2 descendientes de padres F_1 (heterocigotas) validados molecularmente por SNP.....	88
Iic. Resultados	92
Iic.1. Obtención de semillas de la segunda generación filial (F_2) a partir de individuos F_1	92
Iic.2. Caracterización y análisis de atributos – marcadores morfológicos de los individuos F_2	98
Iic.3. Obtención de semillas de la tercera generación filial (F_3) a partir de individuos F_2 descendientes de padres F_1 (heterocigotas) validados molecularmente por SNP.....	100
Iic. Discusión Parcial	102
 CAPÍTULO III. Caracterización del tipo de herencia de los genes <i>Rdc</i> por genética clásica – convencional basado en la asistencia de MM SNP en la filial F_1.....	 105
Actividades desarrolladas para cumplir el Objetivo Específico 2a	106
IIIa. Materiales y Métodos	106
IIIa.1. Evaluación de la respuesta fenotípica (R/S) de familias $F_{2,3}$ derivadas de cada individuo F_2 al interactuar con una cepa seleccionada de <i>Dpc</i>	106
IIIa. Resultados	111

IIIa.1. Evaluación de la respuesta fenotípica (R/S) de familias $F_{2:3}$ derivadas de cada individuo F_2 al interactuar con una cepa seleccionada de <i>Dpc</i>	111
IIIa.1.1. Filiales derivadas entre los progenitores Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible, COD 1-258-2.....	111
IIIa.1.2. Filiales derivadas entre los progenitores Ge(13) resistente x Ge(12) susceptible, COD 1-157-1/2	113
IIIa. Discusión Parcial	114
Actividades desarrolladas para cumplir el Objetivo Específico 2b y 2c	116
IIIb. Materiales y Métodos	116
IIIb.1. Análisis de segregación de las familias $F_{2:3}$ o Pruebas de Progenie	116
IIIb.2. Análisis de independencia entre genes asociados a caracteres morfológicos y a la resistencia a CTS- <i>Dpc</i>	117
IIIb. Resultados	118
IIIb. Caracterización fenotípica de poblaciones segregantes frente a CTS- <i>Dpc</i> . Análisis de segregación de las familias $F_{2:3}$ o Pruebas de Progenie	118
IIIb.1. Familias $F_{2:3}$ provenientes del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), COD 1-258-2.....	118
IIIb.2. Análisis de independencia entre genes asociados a caracteres morfológicos y a la resistencia a CTS- <i>Dpc</i>	120
IIIb.3. Familias $F_{2:3}$ provenientes del cruzamiento Ge(13) x Ge(12), COD 1-157-1/2.....	121
IIIb. Discusión Parcial	125
CAPÍTULO IV. Discusión Integradora	129
CAPÍTULO V. Conclusiones	137
CAPÍTULO VI. Bibliografía	139

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CTS	Cancrosis del Tallo de Soja
cv(s)	cultivar(es)
<i>D/P</i>	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>
<i>Dpm</i>	<i>Diaporthe phaseolorum</i> variedad <i>meridionalis</i>
<i>Dpc</i>	<i>Diaporthe phaseolorum</i> variedad <i>caulivora</i>
dpi	días post inoculación
MM	Marcador(es) Molecular(es)
MR	Moderadamente Resistente
MS	Moderadamente Susceptible
PM	Planta(s) Muerta(s)
PV	Planta(s) Viva(s)
R	Resistente
S	Susceptible
SNP	Polimorfismos de un Nucleótido Único (de sus siglas en inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
%PM	Porcentaje de Plantas Muertas

RESUMEN

La agricultura moderna requiere estrategias que incrementen la productividad de manera sustentable y el compromiso de mejorar y preservar la calidad de vida urbana, rural y el ambiente. Estados Unidos, Brasil y Argentina son los principales productores mundiales de soja; siendo los responsables del 80% de la producción de grano entre 1996-2017. En Argentina y el mundo las enfermedades causan pérdidas del 10-15%, constituyendo un factor limitante para el rendimiento y calidad de granos, semillas y derivados. La cancrrosis del tallo de soja (CTS) es causada por el hongo *Diaporthe phaseolorum* en sus dos variedades: var. *meridionalis* (*Dpm*) y var. *caulivora* (*Dpc*). En el germoplasma de soja se identificaron 4 genes de resistencia dominantes, independientes y de herencia simple para la CTS-*Dpm*, actualmente denominados *Rdm1-4*. Posteriormente, se identificó y localizó en el mapa genético de soja al gen *Rdm5*. Sin embargo, los genes *Rdm* identificados para CTS-*Dpm*, no eran efectivos frente a CTS-*Dpc*. En consecuencia y dado que en el germoplasma de soja aun no habían sido identificados los genes *Rdc* para CTS-*Dpc*, esta enfermedad representó un desafío relevante en las últimas dos décadas. En virtud de que ciertos estudios realizados previamente habían mostrado la existencia de genotipos de soja con resistencia a CTS-*Dpc*, se propuso identificar y definir la herencia de genes *Rdc* de resistencia a esta enfermedad a través de técnicas mendelianas clásicas combinadas con marcadores moleculares específicos. Durante el desarrollo de esta tesis se obtuvieron cruzamientos efectivos entre genotipos diferenciales resistentes y susceptibles a CTS-*Dpc*, y sus respectivas F_1 . En esta etapa se incorporó el uso de marcadores moleculares como técnica biotecnológica complementaria, permitiendo detectar polimorfismos entre progenitores diferenciales y validar molecularmente a los individuos heterocigotas F_1 . Esta validación de la dotación heterocigota de los individuos F_1 , resultante de la hibridación efectiva entre sus progenitores, permitió avanzar en la obtención segura de las poblaciones segregantes F_2 y F_3 . Luego, mediante la inoculación de una cepa seleccionada de *Dpc*, se caracterizó la reacción fenotípica de resistencia/susceptibilidad frente a CTS-*Dpc* de los progenitores (Resistente y Susceptible), los individuos F_1 , los individuos F_2 y las plantas de cada familia $F_{2:3}$ derivadas de una misma planta F_2 (Pruebas de Progenie). A través de las proporciones fenotípicas observadas en las Pruebas de Progenie y filial F_3 se logró inferir las proporciones genotípicas esperadas de los individuos respectivos antecesores en la generación F_2 . Como resultado, se logró detectar la

presencia de un gen mayor de herencia simple que confiere resistencia a la CTS, siendo identificado como *Rdc1*, constituyendo éste el primer reporte mundial sobre genes de resistencia (*Rdc*) a CTS-*Dpc*. Los resultados obtenidos dieron cumplimiento a los objetivos planteados y permitirán además introgresar este gen *Rdc* de resistencia a CTS-*Dpc* en el germoplasma elite de soja, agregando valor e interés en los actuales programas de mejoramiento. Así, el mejoramiento genético convencional combinado con el uso de las nuevas herramientas biotecnológicas, seguirá contribuyendo al desarrollo de una agricultura sustentable y la reducción de la contaminación química y biológica residual.

ABSTRACT

SEARCH AND IDENTIFICATION OF RESISTANCE TO SOYBEAN STEM CANKER CAUSED BY *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*

Modern agriculture requires strategies that increase productivity in a sustainable manner and commitment to improve and preserve the quality of urban, rural and environmental life. In Argentina and the world, soybean diseases constitute a limiting factor of yield and quality of the grains, seeds and derivatives, causing between 10 and 15% of losses. Soybean stem canker (SSC) is caused by two varieties (var.) of the fungus *Diaporthe phaseolorum*: var. *meridionalis* (*Dpm*) and var. *caulivora* (*Dpc*). In soybean germplasm resistance genes were identified for SSC-*Dpm*. However, soybean genotypes bearing *Rdm* genes were not effective against SSC-*Dpc*. Since soybean germplasm does not have *Rdc* genes identified for SSC-*Dpc*, this disease represents a relevant challenge. In this context, it was proposed to identify and define the inheritance of *Rdc* resistance genes to SSC-*Dpc* through classical mendelian techniques assisted by specific molecular markers. Effective crosses between resistant and susceptible genotypes to SSC-*Dpc*, plus their respective F₁, were obtained. At this stage, the use of molecular markers was incorporated as a complementary biotechnological technique, allowing the detection of polymorphisms between differential progenitors and the molecular validation of F₁ heterozygous individuals. The validation of the heterozygous endowment of F₁ individuals, resulting from the effective hybridization of their parents, allowed to progress in the secure obtaining of segregating populations F₂ and F₃. Later, through the inoculation of a selected *Dpc* isolate, phenotypic reaction of the resistance/susceptibility to SSC-*Dpc* was evaluated in the progenitors (Resistance and Susceptible), F₁ individuals, F₂ individuals and plants of each F_{2:3} family derived from a single plant F₂ (Progeny tests). Through the phenotypic proportions observed in Progeny tests and F₃ individuals, genotypic proportions of F₂ population were calculated. As a result, the detection of the presence of a major gene of simple inheritance that confers resistance to SSC, identified as *Rdc1*, was detected, constituting the first report about resistance genes to SSC-*Dpc*. The results allowed to achieve the proposed objectives and advance in the study of new *Rdc* genes for SSC-*Dpc* and resistance genes for others important diseases, adding value and interest in the current breeding programs. For this reason, conventional breeding combined with new biotechnology

techniques offers a relevant and accessible tool that contributes to decrease chemical-biological residual contamination and improves the development of a sustainable agriculture.

CAPÍTULO I

Introducción, Hipótesis y Objetivos

INTRODUCCION

Los cereales y oleaginosos son cultivos relevantes en la región agrícola de Argentina, tanto por el volumen comercializado en productos primarios como en subproductos y derivados, sean harinas, aceites y/o bio-combustibles. En referencia al cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], Argentina es el tercer productor mundial de poroto de soja, con el 18% del total del mercado, detrás de Estados Unidos y Brasil. Además, nuestro país ocupa la misma posición como exportador de grano, productor de harina, aceite y biodiesel en base a soja (Fig. 1) (Ybram y Lacelli, 2016).

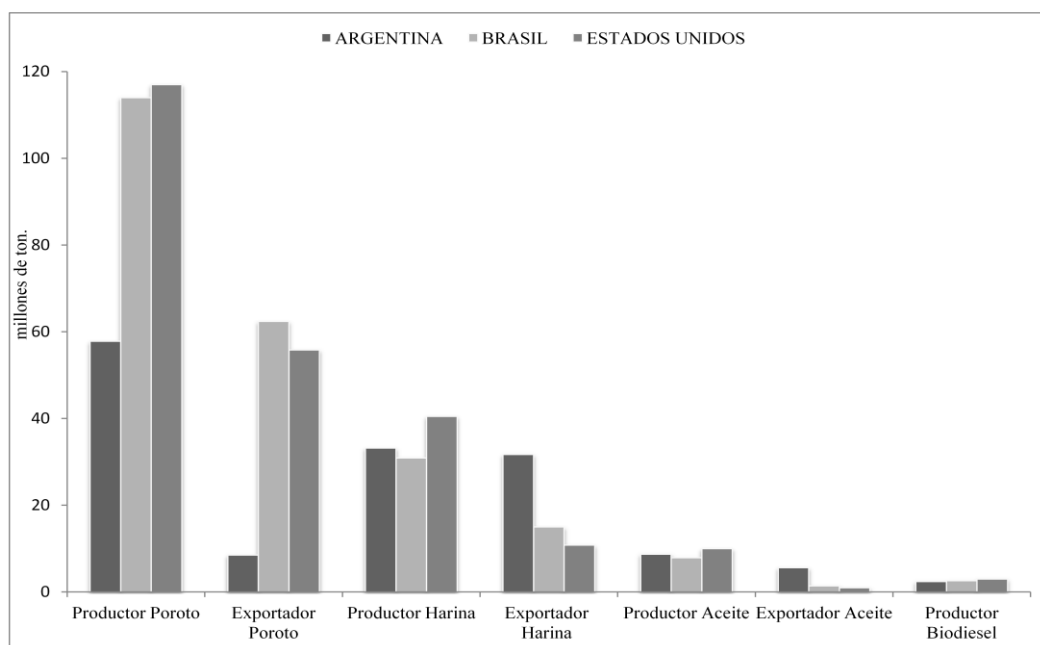


Figura 1. Ranking mundial de los tres países líderes en producción y exportación de soja y derivados (en millones de toneladas).

En nuestro país, la producción anual de soja es de entre 50 y 60 millones de toneladas, exportándose un 78%, lo que representa aproximadamente un cuarto de las divisas que genera la Argentina. De las aproximadamente 20 millones de hectáreas que se cultivan anualmente, poco más del 80% se distribuye en Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos, mientras que el resto se reparte en 11 provincias (Bolsa de Comercio de Rosario, 2017). Se estima que el volumen de actividad económica involucrado en la producción de soja en la campaña 2014/15 fue equivalente a un 5,5% del producto bruto interno argentino, ligado a la

utilización de insumos tales como agroquímicos y fertilizantes; pero también relacionado a la aplicación de tecnología, como la utilización de biotecnología para el desarrollo de semillas y el perfeccionamiento en las maquinarias (Ploper, 2011; Calzada y Corina, 2017).

Las enfermedades de este cultivo constituyen un factor limitante de riesgo actual y epidemiológico en el mediano plazo, y afectan tanto el rendimiento como la calidad del grano, semillas y derivados de la soja (Allen y Malvick, 2017; Matsuo et al., 2017). A nivel mundial se calcula que las pérdidas causadas por enfermedades han oscilado entre 10 y 15 % (Wrather et al., 1997; 2010; Hartman et al., 1999; 2015a). En Argentina, las enfermedades de origen biótico informadas son aproximadamente 40 y causan pérdidas entre 8 y 10 % de la producción (Ploper, 2004; 2014; 2015; Wrather et al., 2010).

Asimismo, la respuesta efectiva de una planta a la infección por un agente causal biótico requiere del oportuno reconocimiento del patógeno y la rápida producción de compuestos-metabolitos capaces de neutralizarlo, cuya expresión y niveles endógenos están regulados por los genes de resistencia (genes R) (Agrios, 2005). Este tipo de resistencia a enfermedades está controlada generalmente por genes mendelianos, pero no fue hasta el año 1955 que el Dr. Harold Henry Flor postuló las bases genéticas de la resistencia. Flor demostró que la resistencia del lino a su patógeno fúngico *Melampsora lini* era la resultante de la interacción de un par específico de genes, uno perteneciente al genoma de la planta hospedante y el otro perteneciente al genoma del patógeno invasor. Esto introdujo las bases teóricas para la hipótesis *gen a gen* de las interacciones planta-patógeno (Flor, 1971). Esta hipótesis indica que la interacción de la respuesta de defensa en la planta que conlleva a la resistencia es iniciada en la planta por el reconocimiento raza-específico de moléculas señales (elicitors) producidos por el patógeno. Este reconocimiento de la planta está mediado directa o indirectamente por los genes R, mientras que los elicitors están codificados directa o indirectamente por los genes de avirulencia (*Avr*) (Vanderplanck, 1963; Staskawicz et al., 1995). Para cada gen *R* (alelo) que condiciona la resistencia en la planta hospedante, existe un gen *Avr* (alelo) correspondiente que condiciona la patogenicidad en el patógeno (Flor, 1971; Vanderplanck, 1978; Staskawicz et al., 1995). Por ello, en el marco de la agricultura moderna que requieren estrategias que incrementen la productividad de manera sustentable con el ambiente urbano y rural. Resulta crucial la incorporación de genes R como método efectivo para reducir el daño causado por las enfermedades vegetales.

El complejo fúngico *Diaporthe/Phomopsis* (D/P) incluye patógenos hemibiótrofos de amplia diversidad genética, que sobreviven asociados al cultivo, las semillas y el rastrojo (Fig. 2) (Zhang et al., 1999; Debaeke y Moinard, 2010), e incluyen especies y variedades patogénicas de importancia económica para el cultivo de soja y otros cultivos hospedantes (Van Rensburg et al., 2006; Santos y Phillips, 2009). Al finalizar la década de 1940 y comienzo de los '50s se describió una nueva sintomatología asociada a los tallos de soja en el área centro-norte de Estados Unidos y Canadá, (Welch y Hillman, 1948; Athow y Caldwell, 1954; Snow et al., 1984); siendo denominada Cancrosis del Tallo de la Soja (CTS) o cancro del norte (Crall, 1950). El agente causal fue identificado como *D. phaseolorum* var. *caulivora* (*Dpc*) (Athow y Caldwell, 1954).

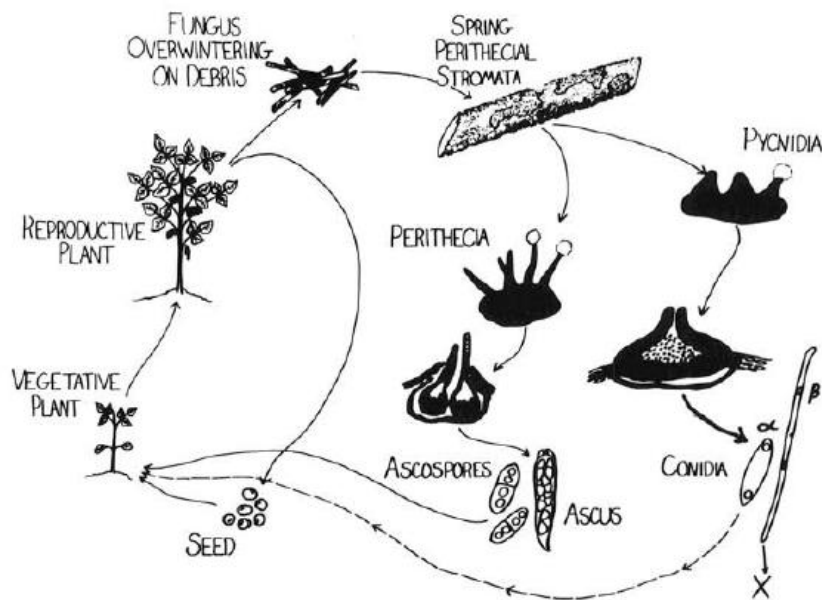


Figura 2. Ciclo de vida del hongo *Diaporthe phaseolorum* (Backman et al., 1985).

Durante la década de 1970, la CTS fue detectada en los estados del sur de Estados Unidos (Backman et al., 1981; Keeling 1982; Snow et al., 1984; Higley y Tachibana, 1987) generando una epidemia en 1983. No obstante, la nomenclatura del agente causal preservó su denominación como *Dpc* durante varios años. Posteriormente, Kulik (1984) definió la nomenclatura doble binomial (género y especie) para el ciclo biológico completo (sexual y asexual) de *Dpc*: *D. phaseolorum* f. sp. *caulivora* (teleomorfo) y *Phomopsis phaseoli* f. sp. *caulivora* (anamorfo). En ese contexto, la forma specialis *caulivora* incluía cepas procedentes

de regiones geográficas diversas y con diferente patogenicidad. A raíz de ello, Keeling (1982; 1984; 1985) reportó diferencias en la virulencia entre las cepas del norte y del sur de Estados Unidos y las identificó como razas fisiológicas de *D. phaseolorum* f. sp. *caulivora*. Si bien las cepas obtenidas en estas dos regiones compartían características biológicas similares, se diferenciaban por su adaptación agroclimática, su patogenicidad y su capacidad de producir fructificaciones asexuales (Backman et al., 1981; Keeling, 1988a; 1988b). Por ello, se propuso que la CTS observada en Estados Unidos fuese reconocida como: CTS del norte (aquella causada por *D. phaseolorum* f. sp. *caulivora*); y CTS del sur (aquella causada por *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis*) (Hobbs y Phillips, 1985; Morgan Jones, 1989; Smith y Backman, 1989). Posteriormente, este estatus taxonómico fue revisado y ambos hongos fueron consideradas dos variedades de la misma especie: *Dpc* y *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (*Dpm*) (Fernández y Hanlin, 1996).

A partir de 1980 y en la década del '90, en Estados Unidos se determinaron cuatro genes dominantes independientes y de herencia simple. Estos genes no alélicos fueron denominados: *Rdc1* y *Rdc2*, presentes en el cultivar (cv.) Tracy-M (Kilen y Hartwig, 1987); *Rdc3* y *Rdc4*, en los cvs. Crockett y Dowling, respectivamente (Bowers et al., 1993). El gen *Rdc4* fue también identificado en el cv. Hutcheson (Tyler, 1996). De acuerdo a la bibliografía, la incorporación de genes de resistencia a la CTS fue realizada en base a la inoculación de cepas obtenidas en estados del sur de Estados Unidos (Tyler, 1996), reconocidas posteriormente como *Dpm*; por lo tanto Pioli y col. (2003) en base a éstos y estudios propios sobre interacciones soja-*Dpm* de Argentina, propusieron red denominar los genes *Rdc1*, *Rdc2*, *Rdc3* y *Rdc4*, como *Rdm1*, *Rdm2*, *Rdm3* y *Rdm4*, respectivamente, siendo internacionalmente aceptado este nuevo criterio para las publicaciones subsiguientes (Chiesa et al., 2009; 2013; 2017).

En Argentina, el agente causal de los primeros reportes de CTS fue identificado como *Dpm*, de acuerdo a la sintomatología, patogenicidad y requerimientos ambientales. En el sur de la Provincia de Santa Fe, *Dpm* fue detectado por primera vez durante la estación de cultivo 1992/1993 (Ivancovich, 1992; Pioli et al., 1993). Posteriormente en 1996/97 y 1997/98, la enfermedad irrumpió causando pérdidas en la zona pampeana núcleo (Pioli et al., 1997) y especialmente en el noroeste (Tucumán) (Ploper et al., 1997). El impacto provocado por la enfermedad determinó que, a partir de la ocurrencia de dichas epifitias, uno de los requisitos

que se exige para registrar cultivares de soja ante el Instituto Nacional de Semillas (INASE) sea su resistencia genética al CTS (Pioli et al., 2000/01; Ploper, 2011).

La mayor diversidad de cepas de *Dpm* y el uso de patrones internacionales permitió: a) caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente a *D/P* en el país; b) detectar variabilidad en la virulencia de cepas de *Dpm* (Pioli et al., 1999); c) determinar la coexistencia de *Dpm* y *Dpc* en la zona productora núcleo (32 a 34° Lat. S) (Pioli et al., 2001); d) establecer que los genes que conferían resistencia a *Dpm* en soja no conferían resistencia ni eran efectivos a *Dpc*, tal lo observado en el cv. Tracy-M, portador de *Rdm1* y *Rdm2*, con comportamiento resistente y sostenidamente efectivo frente a cepas de *Dpm* de diversos ambientes agroecológicos, y de reacción moderadamente susceptible a susceptible frente a cepas locales de *Dpc* (Pioli y Morandi, 2002b; 2002c).

A través de sucesivas evaluaciones de la interacción entre diferentes genotipos de soja portadores de genes *Rdm* identificados, y genotipos susceptibles inoculados con una serie de cepas y variantes de *Dpm* de diverso origen geográfico obtenidos por Pioli (2004), se logró caracterizar el comportamiento patogénico de las cepas de resistencia/susceptibilidad de distintos genotipos de soja. Resultó relevante además determinar que Dowling y Hutcheson, portadores del mismo gen mayor de resistencia (*Rdm4*), manifestaban diferentes niveles de enfermedad, sugiriendo la existencia de otro/s gen/es asociado/s que podrían modificar la reacción de resistencia/susceptibilidad. Se verificó además que la combinación *Rdm1* y *Rdm2* en Tracy-M fue suficiente para conferir resistencia a todas las cepas ensayadas de *Dpm*, pero esta misma combinación *Rdm1* y *Rdm2* no resultó efectiva frente a la infección con cepas de *Dpc* (Pioli et al., 2003). Luego, mediante nuevos estudios sobre *Rdm4* en soja se identificó a *Rdm5*, ligado al *Rdm4*, en una región cromosómica de resistencia en el cv. Hutcheson denominada locus *Rdm4-5* (Chiesa et al., 2009; 2017). Este locus incluiría al menos dos genes de resistencia: el gen *Rdm4* previamente caracterizado (Tyler, 1996) y el nuevo gen *Rdm5* que confiere resistencia específica a distintas cepas locales de *Dpm* (Chiesa et al., 2009; 2017), según el modelo Resistencia/Avirulencia de Flor (1971) y Staskawickz y col. (1995).

En 2000/01-2003/04, la CTS causada por *Dpc* fue informada por primera vez en Sudamérica y adquirió relevancia en Argentina. Los relevamientos efectuados registraron incrementos significativos de CTS causada por *Dpc*, observándose que era la var. *caulivora* el agente causal predominante de la CTS en las provincias de Santa Fe y Buenos Aires (Pioli y Morandi, 2002b; Pioli et al., 2005). La presión de selección ejercida por la incorporación de

genes *Rdm* para controlar *Dpm* favoreció la expansión y predominio de *Dpc* en la región productora de soja. Oportunamente, se alertó sobre las posibles consecuencias epidemiológicas de este hecho. Actualmente la CTS causada por *Dpc* es una de las enfermedades más relevantes por no tener aún genes mayores de resistencia a *Dpc* identificados (Pioli et al., 2003; Scandiani et al., 2009).

No obstante y más allá de la reducción de la variabilidad resultante del proceso de mejora vegetal sobre el fondo genético de *G. max*, la caracterización fenotípica de más de un centenar de genotipos frente a la CTS causada por cepas de *Dpc* de diferentes regiones agroecológicas, entre 1999-2014, permitió lograr avances relevantes en el conocimiento de esta enfermedad: a) ajustar la metodología de infección artificial y lectura de resultados, validación del método y reproducibilidad (Pioli et al., 2003; Peruzzo, 2010b; López Achaval et al., 2014); b) evaluar y reconocer genotipos de soja de comportamiento diferencial frente a CTS- *Dpc* y avanzar en el reconocimiento de al menos tres fuentes de resistencia presentes en el germoplasma de soja frente a *Dpc* (Pioli et al., 2014); c) determinar las tasas de progreso de la enfermedad y diferencias en la agresividad de cepas de *Dpc* (Pioli et al., 2006); d) observar variabilidad patogénica y razas fisiológicas de *Dpc* asociadas a genotipos de soja para grano seco (Pioli et al., 2009; Pioli, 2011), y en soja para consumo de grano verde (Benavidez et al., 2010); como además e) indagar en interacciones de *Dpc* con otros hospedantes (girasol) (Peruzzo et al., 2010a).

En este contexto y hasta el momento de desarrollar este proyecto de tesis doctoral, el mejoramiento del germoplasma de soja orientado a la incorporación de resistencia a la CTS causada por *Dpc*, estaba condicionado o restringido por algunos factores limitantes tales como: a) los genes de resistencia (*Rdc*) a CTS por *Dpc* no habían sido aun identificados en el germoplasma de soja, sea porque no se tenía certeza sobre los genes disponibles en tal germoplasma, porque se desconocían las bases genéticas o modo de herencia de la resistencia de los genes *Rdc* o la combinación de tales factores, y b) la incertidumbre de avanzar generacionalmente y realizar análisis e inferencias genéticas en poblaciones segregantes a partir de individuos F₁ definidos como híbridos y heterocigotas sólo en base a atributos y/o marcadores morfo-estructurales. En dicho contexto y a diferencia del avance reportado en el conocimiento sobre CTS-*Dpm*, no disponer de genes de resistencia *Rdc* identificados frente a CTS-*Dpc* en el germoplasma de soja, motivó que la obtención de cultivares resistentes a CTS-*Dpc* haya sido hasta el momento un proceso arduo y dificultoso.

Por ello, en el marco de esta tesis se abordó la búsqueda e identificación de genes *Rdc* a la CTS causada por *Dpc*. Asimismo, la trascendencia del avance en el conocimiento logrado y aportado por esta investigación será dilucidar y dar respuestas a las limitantes o controversias planteadas anteriormente, aplicando y/o aprovechando las ventajas de estrategias de manejo genético combinadas con herramientas biotecnológicas, claves para minimizar a una de las enfermedades más relevantes del cultivo de soja, de manera sustentable y sin riesgos para la salud humana y del ambiente. Esto indica que se requiere conocer la identidad, el número y el modo de herencia de los genes *Rdc* presentes en los genotipos que sean identificados como fuentes de resistencia a CTS.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1) Si bien la variabilidad presente en el fondo genético de *G. max* mejorada para cultivo es estrecha y limitada, en el germoplasma de soja existe variabilidad genética capaz de proveer al menos un gen de resistencia *Rdc* para ser utilizado como fuente de resistencia a la CTS causada por *Dpc*.
- 2) Existe diversidad genética en el germoplasma del hongo *Dpc* que genera nuevas razas fisiológicas capaces de interactuar y vencer los potenciales genes *Rdc* en soja.
- 3) Existe variabilidad en la respuesta de las interacciones entre genotipos de *G. max* y cepas de *Dpc*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la herencia de genes *Rdc* a la CTS causada por *Dpc*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

OE.1- Referido a la obtención de cruzamientos efectivos (fértil) entre progenitores diferenciales y validación molecular de los híbridos F₁

OE.1a) Obtener cruzamientos efectivos y fértiles entre los genotipos de soja que han expresado un comportamiento diferencial (R/S) frente a cepas de *Dpc* causales de la CTS, de diferente origen y virulencia, y sus respectivos híbridos heterocigotas (F₁).

OE.1b) Validar molecularmente la dotación heterocigota de los individuos F₁ mediante marcadores moleculares de polimorfismos de un nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP).

OE.1c) Avanzar en el desarrollo de poblaciones segregantes F₂ y sus respectivas F₃ y familias F_{2:3} a partir de individuos heterocigotas (F₁) validados molecularmente.

Asociados a la Hipótesis 1

OE.2- Referidos a la caracterización del tipo de herencia de los genes *Rdc* por genética clásica – convencional basado en la asistencia de MM SNP en la filial F₁.

OE.2a) Evaluar e inferir la segregación genotípica del carácter resistencia a CTS causada por *Dpc* en la generación F₂ a través de la respuesta fenotípica de las familias F_{2:3} (Pruebas de Progenie).

OE.2b) Definir el número y el tipo de herencia del/los gen/es *Rdc* a la CTS causada por *Dpc*.

OE.2c) Determinar si el comportamiento de los genotipos resistentes seleccionados a partir de diferentes fondos genéticos como potenciales fuentes de resistencia está regulado por el/los mismo/s o diferente/s gen/es *Rdc* e identificar los genes involucrados.

Asociados a las Hipótesis 2 y 3

Asociado a las Hipótesis 1 y 3

CAPÍTULO II

Obtención de cruzamientos efectivos y fértiles entre progenitores diferenciales y validación molecular de los híbridos F₁.

Actividades orientadas a cumplir el **Objetivo Específico 1 (OE.1a, OE.1b, OE.1c)**

ACTIVIDADES DESARROLLADAS PARA CUMPLIR EL OE.1a:

Obtener cruzamientos efectivos y fértiles entre los genotipos de soja que han expresado un comportamiento diferencial (R/S) frente a cepas de Dpc causales de la CTS, de diferente origen y virulencia, y sus respectivos híbridos heterocigotas (F₁).

Originaria del noreste de China, la soja se ha convertido en el principal cultivo oleaginoso en el mundo debido a su aporte de aceite vegetal y proteína (Graham y Vance, 2003; Mateos-Aparicio et al., 2008; dos Santos Silva et al., 2017). Actualmente ocupa un área de más de 118 millones de hectáreas cultivadas en el mundo (dos Santos Silva et al., 2017), convirtiéndose en un cultivo de gran importancia económica para países como Estados Unidos, China, India, Brasil y Argentina (FAO, 2017). Las enfermedades de origen biótico constituyen un problema relevante en el rendimiento potencial del cultivo (Agrios, 2005), de manera que la mejora en la sanidad es un objetivo a nivel nacional e internacional. La búsqueda de resistencia genética a este tipo de enfermedades se ha incorporado en muchos programas de mejoramiento en todo el mundo, debido a los beneficios adicionales de reducción del uso de agroquímicos (Matsuo et al., 2017). La CTS por *Dpc* es una de las enfermedades más relevantes por no tener aun genes mayores de resistencia identificados (Pioli et al., 2003; Scandiani et al., 2009), lo que impide el desarrollo de nuevos materiales adaptados y productivos. En el mejoramiento, la caracterización de los materiales se realiza mediante el uso de caracteres morfológicos. La herencia de estos caracteres cualitativos en soja se ha descubierto desde principios del siglo XX, desempeñándose como una herramienta sobresaliente para el mejorador a fin de confirmar la efectividad de los cruzamientos realizados entre cultivares seleccionados a partir de diferentes fuentes de germoplasma (Verneti y Verneti Júnior, 2017).

IIa. MATERIALES Y MÉTODOS

IIa.1. Selección del germoplasma fúngico y vegetal

IIa.1.1. Selección del germoplasma fúngico disponible

A partir de la colección fúngica disponible en el área Fitopatología del Laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana (BioVyM) de la Facultad de Ciencias Agrarias e IICAR,

se seleccionó una submuestra representativa de 19 cepas de *Dpc* obtenidos de diferentes cultivos de soja y diversos agro-ecosistemas del centro-sur de Santa Fe y norte-centro de Buenos Aires (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* obtenidas de diferentes agro-ambientes.

Código Fúngico	Localización
<i>Dpc1</i> ^{abc} , <i>Dpc2</i> ^{ab} , <i>Dpc3</i> ^{ab}	Monje, Santa Fe ^e
<i>Dpc5a</i> ^{ab} , <i>Dpc5b</i> ^a	La Salada, Santa Fe ^e
<i>Dpc9</i> ^{ab}	Las Rosas, Santa Fe ^e
<i>Dpc10</i> ^{ab} , <i>Dpc12a</i> ^a , <i>Dpc12tr</i> ^a , <i>Dpc13</i> ^{abc}	Zavalla, Santa Fe ^e
<i>Dpc14a</i> ^{ab} , <i>Dpc14t</i> ^a	Soldini, Santa Fe ^e
<i>Dpc15</i> ^{ab}	San Justo, Santa Fe ^e
<i>Dpc16</i> ^{abc}	Esperanza, Santa Fe ^e
<i>Dpc19</i> ^{ab}	Barrancas, Santa Fe ^e
<i>DpcVTR</i> ^a	Venado Tuerto, Santa Fe ^e
<i>DpcSa</i> ^{abc}	Salto, Buenos Aires ^d
<i>DpcPe</i> ^{abc}	Pehuajó, Buenos Aires ^d
<i>Dpc116</i> ^{ac}	Oliveros, Santa Fe ^e

^aCepas caracterizados molecularmente por RAPD.

^bCepas caracterizados molecularmente por ITS 1 y 2.

^cCepas caracterizados molecularmente por primer específico (Dpc3F; Dpc3R).

^{d,e}Localidades y Provincias de recolección.

Colectores R Wright y RN Pioli. Identificación RN Pioli.

Los mismos fueron recolectados e identificados en el marco de una tesis doctoral (Pioli, 2004) y Proyectos de investigación (PID.AGR100, 184 y 185) (Pioli 2007; 2011). La identidad fúngica fue validada periódicamente mediante marcadores morfológicos y moleculares mediante análisis de polimorfismos por la amplificación al azar del ácido desoxirribonucleico genómico (*Randomly Amplified Polymorphic DNAs* - RAPDs), usando los cebadores OP-AA01 (5'AGACGGCTCC3') y OP-AA06 (5'GTGGGTGCCA3') (Operon Technologies, USA) y otros cebadores específicos (Dpc3F; Dpc3R) realizados entre 1999-2007 en el CICVA INTA Castelar (Pioli et al., 2003; Pioli, 2016; Peruzzo, et al., 2008; Peruzzo, 2010b). Posteriormente, la identidad de las cepas fúngicas fue revalidada por estudios complementarios basados en el análisis de secuencias transcripcionales internas del ADN ribosomal (*Internal transcriptional sequences* - ITS) utilizando los oligonucleótidos o *primers*

ITS1 (5´TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´), ITS2 (5´GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3´) e ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) (Pioli et al., 2009; Peruzzo, 2010b; Hernández et al., 2015) y basados en protocolos propuestos por Fernández y Hanlin (1996); Zhang y col. (1998) y Santos y col. (2010). Asimismo, la virulencia de cada cepa *Dpc* se mantuvo activa realizando inoculaciones periódicas; y a partir de las plantas infectadas y con síntomas de CTS cada cepa fue recuperada de manera individual (4º Postulado de Koch). La identidad fue revalidada además *-in vitro-* a través de sus caracteres macro (color y textura de colonias, fructificaciones asexuales y sexuales) y micro morfológicos (conidios, ascos y ascosporas) para luego ser preservadas como cultivo puro en heladera a 4°C, hasta su utilización.

En base a los valores de severidad promedio causada por cada cepa de *Dpc* evaluado en numerosos estudios previos de interacción planta-patógeno, se seleccionaron cepas de *Dpc* (*Dpc1*, *Dpc13*, *Dpc16*, *DpcSa*) de diverso origen agro-ecológico (Tabla 1) para ser probadas periódicamente en invernadero. Finalmente, para realizar las inoculaciones de la población completa F₃ y familias (F_{2:3}) (Pruebas de Progenie) y F₂ complementarias que se describirán en el Capítulo III, se seleccionó aquella cepa (*Dpc16*) capaz de diferenciar de manera más contundente el comportamiento de resistencia o susceptibilidad de los genotipos progenitores. Las inoculaciones se realizaron de acuerdo al protocolo de Pioli y col. (2003), Chiesa y col. (2009) y Peruzzo y col. (2010a).

IIa.1.2. Selección del germoplasma vegetal disponible

En trabajos previos se evaluaron 137 genotipos de soja en base a la respuesta diferencial frente a CTS causado por *Dpc* observada en condiciones de campo y/o en 405 interacciones evaluadas en invernadero. A partir de allí, se seleccionaron 30 genotipos de soja que fueron inoculados de manera independiente con 3 (mínimo) a 4 cepas de *Dpc* en pruebas de patogenicidad periódicas (Pioli et al., 2003; 2006; 2009; Peruzzo et al., 2008; Benavidez et al., 2010). Posteriormente se realizaron nuevos bioensayos en invernaderos con el fin de caracterizar y verificar el comportamiento de tales genotipos en 246 interacciones genotipos de soja – cepas *Dpc* adicionales (Peruzzo et al., 2010a; 2017c; López Achaval et al., 2014). Tales genotipos de soja proveían de dos-tres distintas fuentes de germoplasma (Pioli et al., 2012).

En este contexto y basados en los valores medios de Severidad frente a CTS-*Dpc* obtenidos en las series de inoculaciones realizadas con un mínimo de tres cepas de *Dpc* (Tabla 1),

evaluados de manera simultánea e independiente, se seleccionaron 12 genotipos reconocidos como Resistentes (R) y 12 reconocidos como Susceptibles (S) (Tabla 2).

Tabla 2. Genotipos seleccionados como progenitores en base a la reacción (resistente y susceptible) a la Cancrosis del Tallo de la Soja causada por *Dpc* (CTS-*Dpc*) y registro de sus caracteres morfológicos.

Reacción de Genotipos frente a Dpc	Código	Grupo de Madurez	Forma folíolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
RESISTENTE	Ge(1)	VII L	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
	Ge(3)	V	lanceolada	púrpura	marrón	tostada	opaco
	Ge(5)	VII	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
	Ge(6)	VII	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
	Ge(8)	VIII	lanceolada	blanca	marrón	tostada	opaco
	Ge(9) ^a	V	lanceolada ^L	blanca ^w	gris	castaña	opaco
	Ge(11)	V	lanceolada	blanca	marrón	tostada	opaco
	Ge(13) ^{bc}	VI	oblonga ^l	blanca ^w	marrón	castaña	opaco
	Ge(17)	V	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
	Ge(19)	VII	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
	Ge(23)	VII	lanceolada	púrpura	marrón	tostada	opaco
	Ge(24)	V	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
SUSCEPTIBLE	Ge(4) ^b	V L	oblonga ^l	púrpura ^w	marrón	castaña	opaco
	Ge(7)	VIII	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
	Ge(10)	IV	oblonga	púrpura	marrón	tostada	Brillante
	Ge(12) ^c	V	lanceolada ^L	blanca ^w	marrón	castaña	Opaco
	Ge(14)	III	oblonga	púrpura	marrón	tostada	Opaco
	Ge(15)	III L	lanceolada	púrpura	marrón	castaña	Opaco
	Ge(16) ^a	VII	oblonga ^l	blanca ^w	gris	castaña	Opaco
	Ge(18)	VII	oblonga	púrpura	marrón	tostada	Opaco
	Ge(20)	IV	oblonga	púrpura	marrón	tostada	Opaco
	Ge(21)	VI	oblonga	blanca	marrón	castaña	Opaco
	Ge(25)	III	oblonga	púrpura	marrón	tostada	Opaco
	Ge(26)	VIII	oblonga	púrpura	gris	castaña	Opaco

^{a,b,c} Ejemplos de diferentes combinaciones de atributos morfológicos.

^{L,l} Genes reguladores del fenotipo de forma de la hoja; ^Llanceolada, ^loblonga.

^{w,w} Genes reguladores del fenotipo de color de flor; ^wpúrpura, ^wblanca.

La reacción de las plantas frente a CTS-*Dpc* fue evaluada utilizando una escala de sintomatología, donde 0 corresponde a una planta sana; 0,5 a una planta infectada viva y 1 a una planta infectada muerta Yorinori (1996). El porcentaje final de plantas muertas (%PM) para cada interacción surge de la escala de Yorinori (1996), donde: $\%PM = \frac{\sum \text{de los valores asignados de severidad}}{\text{total de plantas evaluadas}} \times 100$. Este valor de %PM permitió categorizar a cada progenitor (cultivares o germoplasmas estabilizados) de acuerdo a las siguientes categorías fenotípicas: menor a 25 %PM como Resistente (R); 26 a 50 %PM como Moderadamente Resistente (MR); 51 a 70 %PM como Moderadamente Susceptible (MS); 71 a 90 %PM como Susceptible (S); mayor a 91 %PM como Altamente Susceptible (AS) (según Yorinori (1996), aplicada luego por Pioli y col. (2003) y parcialmente modificada por Chiesa y col. (2009).

IIa.2. Cruzamientos entre genotipos de soja y obtención de la primera generación filial (F₁)

Con la semilla certificada de cada genotipo seleccionado como progenitor R y S se realizaron dos tipos de cruzamientos o fecundaciones:

- a) cruzamientos complementarios entre progenitores seleccionados como RxS.

Estos cruzamientos fueron implementados entre genotipos de soja discrepantes respecto a su reacción de R o S frente a CTS-*Dpc* (cruzamientos complementarios).

En tales cruzamientos (RxS) se realizaron fecundaciones entre cada uno de los progenitores R con todos los progenitores S (Tabla 2), de acuerdo a los criterios reportados y aplicados en el mejoramiento genético (Cubero, 2002) para definir la herencia de los genes *Rdc* a través de las poblaciones segregantes. Durante 2013/14 y 2014/15 se efectuaron 288 combinaciones de cruzamientos complementarios, 144 RxS y 144 de sus recíprocos SxR. Para ello, en un invernadero de malla y cubierta superior antigranizo se realizaron 4 siembras escalonadas, a intervalos de 4 días. Se usaron macetas de 3 litros con una mezcla 2:1 de suelo/vermiculita, y se sembraron 4 semillas pregerminadas por genotipo (Fig. 3A y B).

Las hibridaciones se realizaron por la mañana, de acuerdo a lo propuesto por Byth (1966). A medida que las plantas iniciaban su estadio de floración, se procedió a emascular a las flores aún inmaduras, en estadio de primordios florales o pimpollo cerrado, para ser usadas como receptoras y utilizar flores más avanzadas, en antesis, como polinizadoras o dadoras de polen. En la flor receptora de polen (femenina), en estadio de pimpollo inicial y en el momento en

que los pétalos apenas eran visibles, se retiraron los sépalos, pétalos y el *anillo de estambres*, siendo esto último el principal control para reducir al mínimo la posibilidad de autofecundación (Weiss, 1949). Simultáneamente, cuando la flor dadora de polen (masculina) estuvo totalmente abierta, en coincidencia con el inicio de antesis, se tomó el anillo de estambres para polinizar. Las flores emasculadas fueron rotuladas con etiqueta luego del cruzamiento. Post emasculación, durante el desarrollo de vainas, en las flores que se utilizaron comoceptoras de polen, se realizó un control morfológico-estructural adicional. Este control post emasculación, en el caso de presentarse, consistió en la observación de un halo necrótico sobre el braquiblasto (estructura antófila que sostiene a los diferentes verticilos florales) como signo de cicatrización posterior a la remoción de los sépalos (Peruzzo et al., 2015).

b) cruzamientos entre progenitores seleccionados como R.

Estos cruzamientos RxR se realizaron para *verificar* si los padres R eran portadores de diferentes o bien del/los mismos gen/genes *Rdc*; *identificar* los genes *Rdc* presentes en los fondos genéticos usados como fuentes de resistencia y para explorar además eventuales segregaciones transgresivas, de acuerdo a Cubero (2002).

Los cruzamientos (RxR) se realizaron entre cada uno de los progenitores con el resto de los genotipos seleccionados como R. En base a lo realizado en 2013/14 para los cruzamientos complementarios (RxS), se efectuaron 132 combinaciones de cruzamientos incluyendo los RxR y sus recíprocos, durante el ciclo 2014/15. Se realizaron 6 siembras escalonadas a intervalos de 4 días, incluyendo 4 semillas por genotipo (Fig. 3B). Las plantas se desarrollaron dentro de una estructura con protección antigranizo y a medida que las flores maduraban se procedió a su emasculación, tal lo descripto previamente. De esta manera se puede definir el número de genes *Rdc* en base a las proporciones resultantes de la segregación fenotípica del carácter resistencia a la CTS (Cubero, 2002), de acuerdo a lo aplicado por Kilen y Hartwig (1987), Bowers y col. (1993) y Tyler (1996) para identificar los genes *Rdm1-Rdm4* de resistencia a CTS causado por *D. phaseolorum* var. *meridionalis*.



Figura 3. Producción de semilla de la primera generación filial (F_1) en invernadero de malla y cubierta superior antigranizo. **A.** Período 2013/14; **B.** Período 2014/15; **B1.** cruzamientos RxS; **B2.** cruzamientos RxR. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2013/14 y 2014/15.

Durante el desarrollo de los genotipos paternos seleccionados por su reacción (R/S) frente a la CTS causada por *Dpc*, se registraron caracteres o marcadores fenotípicos de tipo morfológico (forma de la hoja, color de flor, color de pubescencia, color de vaina y brillo de tegumento) propuestos como descriptores de cultivares de soja por INASE (Tabla 3). Además se realizaron controles durante y post emasculación (marca-cicatriz por retiro de verticilos forales).

Transcurridos 240 ± 10 días, se cosecharon las vainas, se trillaron y se almacenaron en bolsas de papel a 4° C en heladera.

Tabla 3. Caracteres morfológicos y el modo de herencia esperado en el germoplasma de *Glycine max* (Giancola, 1998).

Caracteres fenotípicos	Variantes de caracteres fenotípicos	Modo de herencia
Forma del folíolo	1. Lanceolado 2. Oblongo	La característica está determinada por un gen. Las formas más anchas (de tipo ovaladas), resultan del alelo dominante (<i>Ln</i>) y para las formas más angostas (de tipo oblongo o lanceolado), del alelo recesivo (<i>ln</i>). La diferencia está dada por el tamaño del eje longitudinal con respecto al eje transversal. La observación se realizó sobre el folíolo central (que es el de mayor tamaño) de la 1° y 2° hoja trifoliada. Bernard and Weiss, 1973
Color de flor	1. Púrpura 2. Blanca	El color de flor está determinado por un gen. El color púrpura es determinado por el alelo dominante (<i>W1</i>) y el color de flor blanca por el alelo recesivo (<i>w1</i>). Las observaciones se realizaron en el estadio R2, donde las flores están completamente abiertas. Hartwig and Hinson, 1962 Buzzell et al. 1974, 1977

Caracteres fenotípicos	Variantes de caracteres fenotípicos	Modo de herencia
Color de pubescencia	1. Marrón claro/Gris 2. Marrón	<p>Las variantes están controladas por un gen simple; un alelo dominante (<i>T</i>) confiere el color marrón y un alelo recesivo (<i>t</i>) el color gris. El color marrón indica la presencia de una enzima denominada quercetina. En plantas jóvenes el color no se encuentra definido, por esta razón esta característica se analiza luego de varias semanas de crecimiento de las plantas. La pigmentación es retenida en los estadios maduros, facilitando su observación principalmente en los tallos.</p> <p style="text-align: right;">Piper and Morse, 1910 Woodworth, 1921 Nagai, 1921 Williams, 1952 Bernard, 1975</p>
Color de Vaina	1. Tostado 2. Negro 3. Castaño 4. Amarillo paja/Gris	<p>Los colores dependen de la presencia o ausencia de distintos pigmentos. El carácter se encuentra regulado por dos genes <i>L1</i> y <i>L2</i>. Se sabe que <i>L1L2</i> confiere un color negro. El color castaño está determinado por <i>l1L2</i>, tostado por <i>L1l2</i> y el color gris por <i>l1l2</i>. Los datos fueron obtenidos en el estadio R4 o R5.</p> <p style="text-align: right;">Piper and Morse, 1923 Woodworth, 1923 Bernard, 1967</p>
Brillo del tegumento	1. Opaco 2. Brillante	<p>Los genes <i>B1</i>, <i>B2</i> o <i>B3</i> están involucrados en el brillo del tegumento de la semilla. Los alelos recesivos de los mismos <i>b1</i>, <i>b2</i> o <i>b3</i> determinan la ausencia de brillo del tegumento.</p> <p style="text-align: right;">Woodworth, 1932, 1933 Tang y Tai, 1962</p>

IIa. RESULTADOS

IIa.1. Cruzamientos entre genotipos de soja y obtención de la primera generación filial (F₁)

La efectividad de las fecundaciones se constató mediante los marcadores morfológicos descritos en las Tablas 2 y 3, biológicos (extracción de los estambres inmaduros) y estructurales histológicos (marca-cicatriz por retiro de verticilos forales) implementados durante y post emasculación y detallados en materiales y métodos. Los cruzamientos efectivos y fértiles completaron el ciclo de desarrollo y produjeron semillas F₁ (Fig. 4).

De las 288 combinaciones de cruzamientos RxS (cruzamientos entre un padre R y todos los S, para todos los padres R propuestos) realizadas con sus recíprocos, se lograron 60 combinaciones fértiles (20,83%) y productoras de vainas y semillas.

Para el caso de cruzamientos RxR y sus recíprocos, de un total de 132 combinaciones posibles (cruzamientos entre un padre R y todos los R, para todos los padres R propuestos), se obtuvieron 19 combinaciones fértiles de los mismos (14,39%).



Figura 4. Preparación de flores para el cruzamiento y obtención de vaina F₁ con marcador morfológico de cruzamiento efectivo (línea necrótica proveniente del corte del cáliz). Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2013/14 y 2014/15.

La producción de semillas F₁ considerando únicamente los cruzamientos RxS para los dos ciclos productivos 2013/14 y 2014/15, fue de 38,49 (97/252) y 47,06% (120/255),

respectivamente. El análisis de los datos mostró que la producción de semilla F₁ en diferentes ciclos anuales fue igualmente efectiva ($\chi^2= 3,799$; $P= 0,05$).

Al comparar la producción de semillas F₁ obtenidas a partir de los cruzamientos RxS y RxR, desarrollados durante el mismo ciclo anual de producción (2014/15), se obtuvo 47,06 (120/255) y 25,82% (95/368), respectivamente. En este caso la producción de semilla F₁ para las interacciones RxS fue significativamente mayor a la generada para las interacciones RxR ($\chi^2 > 10,83$; $P < 0,001$). Al evaluar la cantidad de semillas producidas a partir de vainas efectivas en interacciones RxS y RxR se obtuvieron vainas con 1 a 3 semillas, resultando un número promedio de 1,61 y 1,73 semillas por vaina, respectivamente. Desde el punto de vista biológico, se obtuvieron ~2 semillas promedio por vaina, no observándose diferencias entre ambos tipos de cruzamientos.

La Tabla 4 muestra los genotipos paternos y el número de sus respectivas filiales F₁ obtenidas en fecundaciones complementarias (RxS) y RxR realizadas durante los años 2013 a 2015.

Tabla 4. Genotipos (Ge) paternos, número de vainas producidas y semillas F₁ obtenidas a partir de cruzamientos complementarios (2013-2015) y RxR efectivos realizados en 2014-2015.

Fecundaciones efectivas R-S			Fecundaciones efectivas R-R		
Cruzamiento de origen	Nro. vainas F ₁	Nro. semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Nro. vainas F ₁	Nro. semillas F ₁
Ge(5) x Ge(18)	3	3	Ge(5) x Ge(8)	10	19
Ge(5) x Ge(12)	1	2	Ge(5) x Ge(13)	5	8
Ge(5) x Ge(4)	6	13	Ge(5) x Ge(6)	3	7
Ge(5) x Ge(14)	1	1	Ge(5) x Ge(19)	11	16
Ge(5) x Ge(10)	1	2	Ge(8) x Ge(13)	1	1
Ge(8) x Ge(18)	4	5	Ge(8) x Ge(9)	1	1
Ge(8) x Ge(12)	4	5	Ge(8) x Ge(19)	1	2
Ge(8) x Ge(10)	3	6	Ge(13) x Ge(19)	5	10
Ge(8) x Ge(7)	3	6	Ge(17) x Ge(19)	2	3
Ge(13) x Ge(18)	26	31	Ge(6) x Ge(9)	8	17
Ge(13) x Ge(15)	2	2	Ge(6) x Ge(19)	5	9
Ge(13) x Ge(12)	5	7	Ge(6) x Ge(13)	4	7
Ge(13) x Ge(4)	9	9	Ge(6) x Ge(8)	3	3
Ge(13) x Ge(14)	13	15	Ge(9) x Ge(19)	7	16
Ge(13) x Ge(20)	1	1	Ge(9) x Ge(13)	10	15
Ge(13) x Ge(16)	2	3	Ge(9) x Ge(5)	3	5
Ge(13) x Ge(21)	2	5	Ge(23) x Ge(17)	5	7

Fecundaciones efectivas R-S			Fecundaciones efectivas R-R		
Cruzamiento de origen	Nro. vainas F ₁	Nro. semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Nro. vainas F ₁	Nro. semillas F ₁
Ge(13) x Ge(17)	3	4	Ge(24) x Ge(23)	3	3
Ge(13) x Ge(7)	2	3	Ge(24) x Ge(17)	4	8
Ge(6) x Ge(18)	2	4	TOTAL	91	157
Ge(6) x Ge(15)	2	4			
Ge(6) x Ge(12)	6	7			
Ge(6) x Ge(4)	1	3			
Ge(6) x Ge(10)	2	4			
Ge(6) x Ge(20)	1	2			
Ge(6) x Ge(25)	5	8			
Ge(9) x Ge(18)	7	8			
Ge(9) x Ge(12)	1	2			
Ge(9) x Ge(20)	2	2			
Ge(9) x Ge(16)	1	1			
Ge(19) x Ge(18)	2	5			
Ge(19) x Ge(15)	1	2			
Ge(19) x Ge(4)	6	16			
Ge(19) x Ge(14)	3	6			
Ge(19) x Ge(25)	1	3			
Ge(19) x Ge(26)	2	5			
Ge(19) x Ge(16)	2	6			
Ge(23) x Ge(15)	3	5			
Ge(23) x Ge(4)	3	5			
Ge(23) x Ge(14)	1	2			
Ge(23) x Ge(25)	3	5			
Ge(23) x Ge(26)	2	3			
Ge(23) x Ge(16)	2	4			
Ge(24) x Ge(15)	5	11			
Ge(24) x Ge(14)	7	16			
Ge(24) x Ge(20)	2	5			
Ge(24) x Ge(26)	7	9			
Ge(24) x Ge(16)	10	23			
Ge(17) x Ge(14)	1	1			
Ge(17) x Ge(20)	3	5			
Ge(17) x Ge(26)	1	2			
Ge(1) x Ge(7)	1	2			
Ge(1) x Ge(18)	3	3			
Ge(1) x Ge(12)	5	7			
Ge(3) x Ge(18)	6	8			
Ge(3) x Ge(21)	1	3			
Ge(3) x Ge(12)	1	2			
Ge(11) x Ge(18)	8	10			
Ge(11) x Ge(12)	2	2			

Fecundaciones efectivas R-S		
Cruzamiento de origen	Nro. vainas F ₁	Nro. semillas F ₁
Ge(11) x Ge(21)	6	12
TOTAL	221	356

Durante el desarrollo de los experimentos, se verificaron los cruzamientos efectivos a través de la evaluación de los controles (marcadores) morfológicos y estructurales (marca o cicatriz en la base de las vainas) descritos previamente y de acuerdo a Johnson y Bernard (1962). Adicionalmente, aquellas vainas efectivas que completaron su desarrollo y produjeron semillas F₁ fueron consideradas fértiles. En base a estos conceptos, se observó que del total de 875 fecundaciones de flores emasculadas realizadas tanto en cruzamientos (RxS) como (RxR), se obtuvieron 312 cruzamientos efectivos y fértiles (35,66%) con producción de semillas F₁.

La Tabla 5 muestra la proporción de cruzamientos *efectivos y fértiles* obtenidos a partir del total de cruzamientos realizados, indicando los valores parciales correspondientes a los cruzamientos complementarios (RxS y sus recíprocos) y RxR (y sus recíprocos) para los dos años de producción de semillas, 2013/14 y 2014/15.

Tabla 5. Proporción de cruzamientos efectivos y fértiles obtenidos a partir del número total de cruzamientos realizados (RxS, RxR y sus recíprocos) en dos ciclos anuales 2013/14 y 2014/15.

	Cruzamientos RxS		Cruzamientos RxR		TOTAL
	Proporción efectivos y fértiles				
	RxS	recíprocos SxR	RxR	recíprocos	
Ciclo 2013/14	43/105	54/147	---		97/252
	97/252				
Ciclo 2014/15	56/124	64/131	62/229	33/139	215/623
	120/255		95/368		
TOTAL	99/229	118/278	62/229	33/139	312/875
	217/507		95/368		

Se incluyen a continuación los caracteres morfológicos (forma de folíolo, color de flor, de pubescencia, de vaina, y brillo en el tegumento) observados en cada individuo o planta F₁, indicando además el código de cruzamiento de origen RxS (Tabla 6) o código de cruzamiento de origen RxR (Tabla 7):

Tabla 6. Cruzamiento de procedencia RxS y caracteres morfológicos observados en individuos F₁.

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS					
COD 147-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 148-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 148-2	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 149-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 249-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 151-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 151-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 152-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 152-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 152-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 153-1	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 253-1	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 253-2	lanceolada	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 154-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 154-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 154-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 155-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 155-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 155-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 156-1	lanceolada	púrpura	marrón	castaña	opaco

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS					
COD 156-2	lanceolada	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 157-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 157-2	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 257-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 258-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 258-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 159-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 159-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 259-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 160-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 161-1	oblonga	blanca	gris	castaña	opaco
COD 161-2	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 161-3	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 162-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 162-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 162-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 163-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 163-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 163-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 164-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 164-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 165-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 165-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 165-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 166-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 166-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 166-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 167-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS					
COD 167-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 168-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 168-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 168-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 169-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 169-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 169-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 170-2	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 171-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 171-2	lanceolada	blanca	gris	castaña	opaco
COD 172-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 173-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 173-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 173-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 174-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 174-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 175-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 175-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 175-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 176-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 176-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 176-3	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 177-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 177-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 177-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 178-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 178-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 178-3	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS					
COD 179-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 179-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 179-3	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 180-1	lanceolada	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 180-2	lanceolada	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 180-3	lanceolada	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 181-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 181-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 182-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 182-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 184-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 184-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 185-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 185-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 185-3	lanceolada	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 186-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 186-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 186-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 187-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 187-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 187-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 188-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 188-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 188-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 189-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 189-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 189-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 190-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS					
COD 190-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 190-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 191-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 192-1	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 192-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 192-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 193-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 193-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco

Tabla 7. Cruzamiento de procedencia RxR y caracteres morfológicos observados en individuos F₁.

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamiento RxR					
COD 194-1	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 194-2	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 194-3	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 195-1	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 195-2	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 195-3	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 196-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 196-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 196-3	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 197-1	oblonga	blanca	marrón	tostada	opaco

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamiento RxR					
COD 197-2	lanceolada	blanca	gris	castaña	opaco
COD 197-3	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 198-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 198-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 198-3	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 199-1	lanceolada	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 200-1	lanceolada	blanca	marrón	tostada	opaco
COD 200-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 201-1	lanceolada	blanca	gris	castaña	opaco
COD 202-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 202-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 203-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 203-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 203-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 204-1	lanceolada	blanca	gris	castaña	opaco
COD 204-2	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 204-3	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 205-1	oblonga	blanca	marrón	castaña	opaco
COD 205-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 205-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 206-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 206-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 206-3	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 207-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 207-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	brillante
COD 207-3	oblonga	púrpura	marrón	castaña	brillante
COD 208-1	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 208-2	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco

Código planta F ₁	Caracteres morfológicos observados en F ₁				
	Forma foliolo	Color flor	Color pubescencia	Color vaina	Brillo tegumento
Cruzamiento RxR					
COD 208-3	oblonga	púrpura	gris	castaña	opaco
COD 209-1	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 209-2	oblonga	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 210-1	lanceolada	púrpura	marrón	tostada	opaco
COD 211-1	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 211-2	oblonga	púrpura	marrón	castaña	opaco
COD 211-3	lanceolada	blanca	marrón	castaña	opaco

IIa. DISCUSIÓN PARCIAL

La soja es un cultivo donde la mejora genética ha sido de gran importancia (Bologna et al., 2006). El objetivo principal de este proceso ha sido la adaptación del cultivo a ambientes diversos y el aumento de la productividad para asegurar la provisión de alimentos y subproductos. Este proceso llevó a la utilización de un conjunto estrecho de progenitores como líneas ancestrales, lo que ha producido el progresivo estrechamiento de su base genética (Delanney, et al., 1983; Hymowitz y Bernard, 1991; Bologna et al., 2006). Esto se tradujo en una alta vulnerabilidad del germoplasma tanto a factores bióticos como abióticos. Es por ello que en el marco de esta tesis se tomaron como punto de partida una gran cantidad de progenitores, permitiendo este hecho, a vista de los resultados, poder disponer de la variabilidad genética necesaria y representativa además de las actuales fuentes de resistencia accesibles para los programas de mejoramiento de soja. Esta combinación de factores ha permitido detectar a través de las diversas interacciones planta-hongo realizados en el presente estudio, una mayor diversidad morfológica y de respuestas fisio-genéticas a la CTS causada por *Dpc*, acorde a lo sugerido por Perry y McIntosh (1991), Bhering y col. (2017) Verneti y Verneti Júnior (2017). Los progenitores fueron seleccionados a partir de evaluaciones en sucesivos años (ambientes) y bajo la presión de diversas cepas de *Dpc*

(virulencia), de manera de realizar una mejor selección de genotipos parentales, lo que conlleva a un ahorro de tiempo y recursos humanos y financieros (Bhering et al., 2017).

A fin de seleccionar a favor del carácter deseable, en este caso la resistencia a CTS causado por *Dpc*, se procedió a la generación de las poblaciones tempranas (Filial F₁) mediante polinizaciones cruzadas manualmente. La soja en la naturaleza presenta un alto grado de autopolinización y por ello es considerada una especie autógama. Este evento se debe y ha sido preservado a través del proceso evolutivo principalmente porque la fertilización ocurre cuando la flor aún se encuentra cerrada (Weiss, 1949; Hanson y Weber, 1961; Johnson y Bernard, 1962). Si bien, los insectos pueden transportar el polen, la frecuencia de polinización cruzada continúa siendo menor al 1% (Giancola, 1998). Además se han realizado ensayos de cruzamiento con espaciamentos diferenciales entre diversas plantas usadas como progenitores, pero se obtuvieron proporciones de semilla cruzada aún más baja que en el caso de los insectos (Cutler, 1934). Por ello, en el esquema de hibridaciones planteado, los controles aplicados durante la emasculación, fecundaciones y el control de insectos se consideraron los adecuados para minimizar la polinización cruzada.

Para la preparación de la flor se siguió el protocolo propuesto por Woodworth (1932) y Weiss (1949), que propone como práctica innovadora el retiro del estambre inmaduro en todas las flores que actuaron como receptoras de polen o femeninas. Este trabajo extra, si bien implica mayor tiempo, permitió asegurar la efectividad de los cruzamientos realizados, ya que la aparición de vainas producto de autopolinizaciones aumenta de un 2 a un 30% si se omite la emasculación temprana (Weiss, 1949). El momento en el cual se realizaron las hibridaciones (por la mañana) resultó efectivo, lo cual puede deberse a que el sitio en el cual Byth (1966) realizó sus cruzamientos es similar en latitud al de nuestra región (Brisbane, Australia).

El porcentaje de cruzamientos exitosos usualmente es marcadamente variable. La eliminación de las anteras con frecuencia resulta en lesiones en los otros tejidos o verticilos de la flor y reduce el éxito potencial en la obtención de cruzamientos efectivos. Las vainas resultantes de un cruzamiento se pueden distinguir fácilmente por la ausencia de los lóbulos en la base del cáliz, distinción que puede hacerse más fácilmente cuando las vainas están maduras (Johnson y Bernard, 1962).

En el presente estudio mediante los controles morfológicos y estructurales realizados (marcaticatriz evidentes en la base de las vainas) en todas las flores que actuaron como receptoras de polen durante los dos años de cruzamientos produjeron resultados positivos, en los dos años

de generación de F₁ se lograron fecundaciones con producción de semillas efectivas, en número suficiente para continuar con el proceso de identificación de genes de resistencia a la CTS (1 a 2 semillas por vaina híbrida). De un total de 875 hibridaciones realizadas se obtuvieron 312 cruzamientos efectivos y fértiles (35,66%). Considerando las combinaciones de cruzamientos posibles entre los distintos progenitores, de las 288 combinaciones RxS propuestas y realizadas, el 20,83% produjo cruzamientos efectivos y con vainas fértiles. Mientras que en el caso de las combinaciones de cruzamientos RxR, propuestas y realizadas, un 14,39% produjo cruzamientos efectivos y con vainas fértiles. La producción de semilla proveniente de cruzamientos RxS y sus recíprocos no mostró diferencias significativas entre los dos años de generación de semillas ($\chi^2 = 3,799$; $P = 0,05$). Sin embargo, al evaluar la producción de semillas en cruzamientos RxS y RxR observamos que se obtuvo una mayor proporción de semillas RxS ($\chi^2 > 10,83$; $P < 0,001$) respecto a la generado por RxR. Los resultados obtenidos indican la posibilidad de la existencia de incompatibilidad cruzada homomórfica entre los padres seleccionados para hibridaciones cruzadas. Al respecto, es oportuno señalar que la soja es una especie de autopolinización estricta debido, entre otros factores, a que la polinización finaliza antes de que se abran los pétalos y la interacción entre el *polen-estigma* debe ser compatible para que la vaina se desarrolle (Li et al., 2012a). De acuerdo a lo reportado por Haerizadeh y col. (2009) deben expresarse algunos genes específicos del polen de la soja que codifican factores de transcripción asociados al zinc, entre otros, y receptores de reconocimiento de señales para que la polinización se lleve a cabo. Estos resultados podrían explicar la baja producción de vainas provenientes de cruzamientos RxR que se obtuvieron en esta tesis.

La genética cualitativa ayuda a los mejoradores en la toma de decisiones mientras llevan a cabo programas de mejoramiento (Ramalho et al., 2017). Los caracteres cualitativos de la soja están codificados por uno o unos pocos genes cuya expresión fenotípica está poco influenciada por el medio ambiente, según lo reportado por Verneti y Verneti Júnior (2017). Por ello en el marco de la tesis, las plantas heterocigotas de la filial F₁ e individuos F₂ se caracterizaron y seleccionaron fenotípicamente en base a la observación de aquellos rasgos fenotípicos regidos por un único gen de herencia mendeliana (un par de alelos) y de estimación cualitativa fácilmente ponderada, menos subjetiva y menos condicionada por el ambiente al momento de diferenciar progenitores. Los mismos fueron el color de flor y la forma de la hoja.

El análisis de los caracteres morfológicos observados en cada planta F_1 (Tablas 6 y 7) se ajustó al fenotipo del parental dominante (Tabla 2) para el carácter en estudio y en cada cruzamiento.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS PARA CUMPLIR EL OE.1b:

Validar molecularmente la dotación heterocigota de los individuos F_1 mediante marcadores moleculares de polimorfismos de un nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP).

Los marcadores fenotípicos han sido de utilidad durante el proceso de mejoramiento genético de *G. max*. Sin embargo, estudios previos mencionan ciertas limitaciones en su aplicación debido, entre otros factores, a la reducción del fondo genético resultante de la selección sostenida del germoplasma de soja (Da Silva et al., 2017) y por el efecto ambiental que suele condicionar a algunos atributos morfológicos utilizados como control en F_1 y filiales segregantes (Hartwig y Hinson, 1962; Perry y McIntosh, 1991; Yan et al., 2014). Estos factores generan un problema importante al momento de diferenciar o detectar polimorfismos entre progenitores seleccionados por otros caracteres de interés. Por ello, la selección y control basada solamente en marcadores morfológicos o fenotípicos parece requerir de técnicas complementarias. En consecuencia, la selección asistida por marcadores moleculares es utilizada como una herramienta biotecnológica complementaria capaz de fortalecer y avalar el proceso de selección vegetal para obtener genotipos mejorados y de interés, en menos tiempo y con mayor certeza (Álvarez Gil, 2011). Reconociendo este valor, es que en el marco de esta tesis se propone, *de manera innovadora*, la aplicación de marcadores moleculares específicos orientados *a realizar la caracterización temprana de la primera filial*, esto es la F_1 , permitiendo hacer más eficiente el proceso de selección desde el inicio del proceso de mejoramiento en soja.

IIb. MATERIALES Y MÉTODOS

IIb.1. Validación molecular de la dotación genética de los individuos F_1 en comparación con sus respectivos progenitores, mediante cebadores SNP

Durante el período de octubre-noviembre 2015 se sembraron 1 a 3 semillas F_1 de cada una de las 60 combinaciones RxS y 19 combinaciones RxR provenientes de cruzamientos considerados morfológica y estructuralmente efectivos de acuerdo a los controles realizados

durante y post proceso de castración (Tabla 4). Se sembraron en macetas de 3 litros con una mezcla 2:1 de suelo/vermiculita, ubicadas en un invernadero de malla y con cubierta superior antigranizo (Fig. 5).



Figura 5. Producción de semilla de la segunda generación filial (F_2) en invernadero de malla y cubierta superior antigranizo. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2015.

Durante el período vegetativo de las mencionadas plantas F_1 (Tablas 6 y 7), se tomaron muestras de ocho discos de hojas sanas en estadio fenológico V3 (segunda hoja trifoliada expandida) (Fehr y Caviness, 1977), incluyéndose además discos de material vegetal de las plantas progenitoras como referencia genotípica (Tabla 2) (Fig. 6). Las muestras de tejido fueron rotuladas y almacenadas en freezer a -80°C hasta su procesamiento (liofilizado) y posterior tratamiento y caracterización molecular).



Figura 6. Toma de muestra de discos de hojas de soja sanas en estadio V3 para extracción de ADN. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2015.

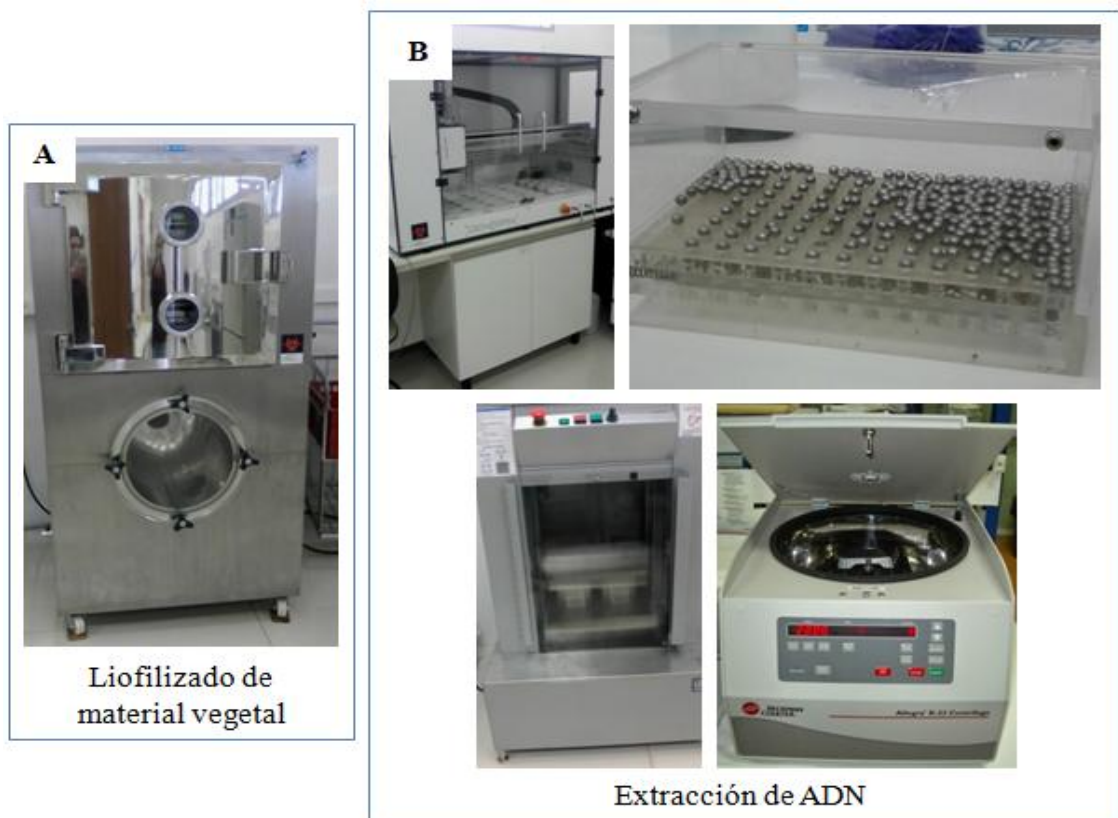
En julio de 2016 se realizó la validación molecular de la identidad de cada uno de los individuos F_1 , obtenidos como resultado de un cruzamiento entre dos líneas puras, para verificar la heterocigosis en relación a los alelos discrepantes que sus padres portaban en homocigosis. Para ello, se utilizó el sistema KASP (PCR competitiva alelo específica, de sus siglas en inglés, *Kompetitive Allele Specific PCR*) SNP Genotyping Chemistry, el cual está basado en la tecnología de transferencia de energía no radiante entre dos fluoróforos, desde un donador (sonda marcada con fluorocromos) a un aceptor (Semagn et al., 2014).

La caracterización molecular de progenitores divergentes para la reacción fenotípica a *CTS-Dpc* y sus respectivas F_1 se realizó con 160 marcadores moleculares SNP seleccionados especialmente por el tipo de alelos que analiza y su localización y distribución en los 20 cromosomas del genoma de soja (Tabla 8). Tales marcadores SNP están disponibles en el Laboratorio de Biología Molecular de la empresa Don Mario Semillas, ubicado en Londrina (Paraná, Brasil), con experticia en el uso de esta técnica de SNP. El estudio fue realizado durante una estancia realizada en el marco de un Convenio Inter Institucional (UNR-GDMseeds).

La validación molecular de la identidad de cada F_1 se realizó en base a un duplicado biológico de las muestras parentales y una única muestra F_1 . El análisis de cada padre y F_1 se realizó en placas micro-tituladoras de 96 pocillos (*wells*) totales. Cada muestra estuvo constituida por 8 discos de hoja liofilizada que se ubicaron en un pocillo individual; para cada padre se contó con dos pocillos (réplica biológica) y una muestra única para cada individuo F_1 (Fig. 7A). La

extracción de ADN se realizó colocando 300 μ L de buffer de ruptura de membrana por muestra o pocillo, cada uno conteniendo una pequeña esfera de acero inoxidable que cumple la función de mortero. Se llevó a agitación durante 12 min y luego se decantó el extracto durante 1 min en centrífuga a 3500 rpm (Fig. 7B). Las muestras se llevaron a 56 °C en estufa durante 45 min y, posteriormente, se trasvasaron con mano robótica a placas de 384 pocillos para su filtración; agregándose 600 μ L de buffer de adhesión de ADN a la membrana de filtración. Las placas se llevaron a 56 °C en estufa durante 45 min y luego se centrifugaron durante 15 min a 3500 rpm (Fig. 7C). Se trasvasaron 1,6 μ L de la mezcla conteniendo el ADN a placas de 1536 pocillos con brazo robótico y se llevaron a 61 °C en estufa durante 2 h, hasta secado (Fig. 7D). Se preparó una mezcla madre de solución KASP con cada marcador molecular de tipo SNP utilizado (140:1). Se colocó 1 μ L de mezcla madre en cada pocillo y la placa se selló con un film y calor (Fig. 7E), a fin de llevar al termociclador Hydrocycler (BIO-RAD).

Para la PCR se trabajó con ciclos térmicos decrecientes, donde los primeros 10 ciclos fueron programados a 94 °C durante 15 seg y a 65 °C por 1 min; seguidos de 31 ciclos a 94 °C durante 15 seg y a 57 °C durante 1 min (Fig. 7F) (Semagn et al., 2014; Peruzzo et al., 2017d).

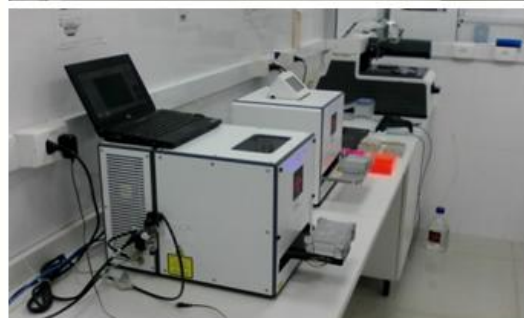




Filtración y centrifugación para separación del ADN



Secado del ADN



Agregado de marcadores moleculares y sellado de placas



PCR en termociclador

Figura 7. Extracción y amplificación de ADN vegetal mediante marcadores moleculares SNP (de sus siglas en inglés, Polimorfismo de Nucleótido Único).

La lectura de resultados se realizó utilizando el lector PHERAstar Plus SNP, el cual midió la absorbancia de cada muestra para cada polimorfismo con el fin de determinar los diferentes alelos (Semagn et al., 2014). Los resultados se reflejaron en una gráfica de dos ejes, de manera que las muestras homocigotas para el polimorfismo a estudiar presentaron dos cromosomas homólogos que dieron lugar a amplicones que se localizaron en uno de los dos ejes, mientras que las muestras heterocigotas para el polimorfismo a estudiar presentaron cromosomas heterólogos (cada uno con un nucleótido diferente), por lo que los amplicones se localizaron en torno a una recta que se dispone entre los dos ejes (Yoon et al. 2007). De esta manera, se asignó el respectivo genotipo a cada F_1 y sus padres.

IIb. RESULTADOS

IIb.1. Validación molecular de la dotación genética de los individuos F_1 en comparación con sus respectivos progenitores, mediante cebadores SNP

La incorporación de MM codominantes permitió la discriminación alélica y la detección de variantes genéticas que afectan a un único nucleótido, con sólo 0,1 a 10 ng de ADN genómico (Semagn et al., 2014). De esta manera, se logró detectar polimorfismos moleculares entre los progenitores seleccionados y antagónicos por su reacción frente a *CTS-Dpc* y validar la dotación heterocigota e híbrida de los individuos F_1 .

Durante el análisis molecular de la primera generación filial realizado en base a 160 cebadores SNP, 146 (91,25%) resultaron polimórficos (*) considerando la totalidad de los 24 progenitores evaluados (Tabla 8). Mientras que la proporción o porcentaje de SNP que resultaron polimórficos para cada par de progenitores cruzados oportunamente puede variar según cada caso de acuerdo a lo presentado en las Tablas 8, 9A, 9B y 9C).

Tabla 8. Cebadores de tipo polimorfismos de un nucleótido único (SNP) utilizados para evaluar los genotipos parentales y generaciones F₁, indicando el cromosoma, su posición en el genoma de soja y el tipo de alelo.

(*) indica marcadores polimórficos

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107913795 *	1	83,799	52545213	A/T
ss107920473 *	15	79,229	43375113	A/C
ss107912981 *	6	67,988	11825219	G/T
ss107928876 *	7	65,753	15403245	C/T
ss107922775 *	9	14,419	2330431	C/T
ss107923139 *	1	49,432	5110583	C/T
ss107913440 *	11	45,373	7847710	A/T
ss107919814 *	5	2,452	621367	C/T
ss107918717 *	15	76,37	20687143	A/G
ss107912624 *	9	9,345	1685571	C/T
ss107919731 *	18	39,861	7276451	A/T
ss107913720 *	13	71,221	34437456	A/G
ss107918199 *	7	87,684	36812647	A/T
ss107928790 *	13	36,736	19330639	C/T
ss107929998 *	13	52,218	27260462	C/T
ss107924009 *	7	48,431	8653581	A/T
ss107914779 *	2	0	133128	C/T
ss107912619 *	18	78,278	57433108	A/G
ss107917623 *	13	35,01	10720129	A/G
ss107914208 *	2	83,356	39559302	A/T

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107912650 *	15	31,257	6661859	A/T
ss107912588 *	8	14,613	2865429	A/G
ss107913529 *	13	75,921	36131667	A/T
ss107930839 *	2	28,431	4550223	C/T
ss107913707 *	7	75,843	24724300	C/T
ss107923832 *	1	65,868	50361054	A/T
ss107920733 *	1	16,723	1744952	A/C
ss107930182 *	1	41,58	43580337	C/G
ss107920328 *	5	49,474	34115113	A/C
ss107918096 *	15	33,181	6827140	C/T
ss107918912 *	5	47,268	33679929	C/G
ss107913217 *	1	59,786	49626079	G/T
ss107923799 *	11	110,289	38224538	A/G
ss107928195 *	1	37,143	4832336	A/G
ss107913582 *	10	58,489	37848577	A/G
ss107923892 *	2	118,341	48374613	A/T
ss107927195 *	17	73,339	16113188	A/G
ss107913261 *	3	62,615	41148027	A/G
ss107915596 *	7	65,876	15355063	G/T
ss107913418	2	132,597	50775209	G/T
ss107921710 *	5	47,268	33699212	A/C
ss107927145 *	9	9,345	1649585	A/G
ss107913817 *	5	36,095	31674096	C/T

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107912776 *	1	41,689	45975848	A/G
ss107917837 *	13	49,32	27049304	G/T
ss107914845 *	7	71,022	17776450	C/T
ss107913925 *	5	6,866	2012668	C/T
ss107915802 *	5	17,406	7997318	A/T
ss107915919 *	7	48,838	9264004	C/T
ss107914547 *	7	72,627	18218036	A/T
ss107920141 *	20	105,669	44687196	A/G
ss107923553	5	41,627	32393482	C/G
ss107913658 *	13	54,078	30582510	A/G
ss107919246 *	3	61,887	41006923	A/C
ss107930879 *	13	12,508	2449784	A/G
ss107927865 *	19	0	216053	C/T
ss107921288 *	1	17,33	1889607	A/G
ss107913472 *	15	39,996	8263546	G/T
ss107929868 *	1	58,225	49315284	A/G
ss107917456 *	4	43,508	8063318	C/T
ss107924319	20	97,406	43687082	A/G
ss107929454 *	6	66,091	11337573	A/G
ss107912802 *	11	111,997	38361932	C/T
ss107921443	18	9,938	1696181	C/T
ss107919507 *	4	14,034	2507830	C/T
ss107923267 *	9	90,392	44745592	A/T

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107926859 *	5	55,158	35096625	C/T
ss107913888 *	16	24,374	3534755	A/C
ss107921198 *	7	49,18	9305361	C/G
ss107914846 *	7	71,558	17703198	C/T
ss107914681 *	7	71,558	17672992	C/T
ss107920392 *	15	85,879	48695522	C/T
ss107918951 *	13	71,893	34841754	A/T
ss107912787 *	3	44,989	37047833	C/T
ss107920652 *	8	58,864	11922610	A/C
ss107920602 *	11	111,022	38345361	G/T
ss107913002 *	9	47,384	37084961	A/G
ss107917765 *	1	54,864	48746290	A/C
ss4969672	1	95,232	54743375	T/G
ss107929621 *	2	84,305	40623500	C/T
ss107926142	19	27,382	8345615	C/T
ss107921460 *	17	41,551	8841544	A/T
ss107913342 *	4	10,513	1553546	A/T
ss107912830	9	45,245	36737856	C/T
ss107916923 *	2	103,895	46042281	C/G
ss107923585 *	1	60,624	50073227	C/T
ss107913794	2	131,851	50692715	A/G
ss107928020 *	1	43,745	28832403	A/G
ss107922655 *	9	77,44	42505332	A/G

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107914377 *	16	67,895	31635485	A/C
ss107917285 *	7	61,291	15306117	G/T
ss107923130 *	5	37,896	31885239	C/T
ss107923460 *	9	76,078	42173342	G/T
ss107928136 *	1	37,971	36366505	C/G
ss107913100 *	7	50,249	9628883	A/T
ss107913705 *	2	94,879	44109126	A/C
ss107923556 *	2	45,028	8173288	A/G
ss107913739	17	41,59	8839766	A/T
ss107921577 *	2	0,947	601819	A/T
ss107916303 *	3	45,589	37309964	A/G
ss107919964 *	16	23,797	2959847	G/T
ss107923047 *	5	71,832	37781996	G/T
ss107913527 *	14	10,429	1359856	G/T
ss107927778 *	13	35,982	12613764	A/T
ss107923080 *	3	12,532	1118739	A/C
ss107926703 *	15	81,242	43915007	A/C
ss107928522 *	18	60,526	51519139	C/T
ss107922581 *	15	80,371	45424731	A/T
ss107918865 *	6	102,122	27068672	A/T
ss107922986 *	8	101,521	24848379	G/T
ss107912743 *	12	78,391	35088875	A/T
ss107927719 *	16	67,74	31614106	G/T

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107912541 *	18	9,131	916974	C/G
ss107929884 *	16	71,559	32850616	A/G
ss107922673 *	6	103,198	21977089	A/T
ss107918689 *	3	13,404	1530663	A/T
ss107928831 *	7	74,407	20151943	A/T
ss107913452 *	8	124,762	43855490	G/T
ss107916822 *	14	21,727	4306137	A/G
ss107926727 *	17	32,99	7756097	A/G
ss107921628 *	18	10,063	1749501	A/G
ss107929517 *	10	51,037	19797768	A/C
ss107929343 *	4	52,477	17527542	C/T
ss107929088 *	15	74,805	17015279	C/T
ss107929468 *	8	94,142	19607362	C/T
ss107926274 *	7	75,42	21217604	C/T
ss107926331 *	9	41,311	20620215	C/T
ss107925149	14	35,521	6740860	C/G
ss107913110 *	6	26,077	3790890	A/G
ss107920109 *	16	73,898	33474868	A/G
ss107926354 *	10	65,555	38679245	A/G
ss107929516 *	10	120,355	49969298	C/G
ss107915613 *	8	105,482	39754351	A/G
ss107926089	8	99,803	23138476	A/T
ss107924669 *	18	59,994	51686174	G/T

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
ss107930134 *	3	27,429	8004390	C/T
ss107913818 *	6	103,193	21775917	C/T
ss107924416 *	15	83,042	46577970	C/T
ss107913414 *	15	9,972	2127692	A/G
ss107921721 *	4	52,477	17508515	C/T
ss107923073	3	12,532	1163867	A/T
ss107912841 *	7	71,558	17264179	A/G
ss107919928 *	18	80,96	57797202	C/T
ss107913160 *	2	114,69	47548859	C/G
ss107916198 *	2	44,246	7472790	C/T
ss107929602 *	6	98,146	17185344	A/G
ss107912598 *	18	101,849	60579793	A/G
ss107927406	11	67,932	15066834	A/G
ss107921358 *	5	32,398	28878575	A/T
ss107913226 *	1	91,319	53570724	A/G
GDM_02_10183206*	nd	nd	nd	nd
GDM_02_8658796 *	nd	nd	nd	nd
GDM_02_9927611	nd	nd	nd	nd
GDM_14_2371113 *	nd	nd	nd	nd
GDM_14_2741218 *	nd	nd	nd	nd
GDM_03_5508521 *	nd	nd	nd	nd
GDM_03_5840155 *	nd	nd	nd	nd
GDM_03_7142133 *	nd	nd	nd	nd

Código de SNP	Cromosoma	Posición (cM)	Posición	Alelos
GDM_13_28020561*	nd	nd	nd	nd
GDM_18_60856147*	nd	nd	nd	nd

*Cebadores de un nucleótido único (SNP) que resultaron polimórficos para cada par de genotipos progenitores y su respectiva F₁ evaluada.

La caracterización por SNP permitió validar molecularmente como individuos heterocigotas e híbridos a 78 plantas F₁ (48,75%) del total de aquellas 160 plantas F₁ obtenidas a partir de 79 combinaciones (60 RxS y 19 RxR), evaluadas originalmente por marcadores morfo-estructurales.

En referencia a los resultados para ambos tipos de cruzamientos, 69 plantas F₁ (60%) de aquellas 115 F₁ derivadas de cruzamientos RxS, fueron validadas molecularmente como individuos heterocigotas e híbridos de los respectivos progenitores. Mientras que sólo 9 plantas F₁ (20%) de aquellas 45 F₁ obtenidas a partir de cruzamientos RxR, fueron validadas molecularmente como individuos híbridos y heterocigotas.

IIb.2. Presentación y análisis de datos del programa PHERAstar Plus SNP

La Figura 8 muestra la forma de presentar y analizar los resultados moleculares; y a modo de ejemplo, muestra la salida del programa PHERAstar Plus SNP para el marcador molecular ss107930839 (polimórfico).

En la Figura 8A se observa una gráfica de dos ejes, siendo el eje X el alelo C y el eje Y el alelo T. Los puntos corresponden a las 160 muestras F₁ evaluadas junto con los 24 progenitores y sus respectivos duplicados biológicos. La Figura 8B muestra la disposición espacial de las muestras de ADN en la placa de 1536 pocillos, donde cada color referencia los tipos de alelos de la muestra. Para este caso, el punto rojo significa una muestra que posee ambos alelos C, el punto azul consiste en una muestra que posee ambos alelos T y el punto verde es aquella muestra que posee un alelo C y otro T, siendo una muestra heterocigota para este marcador. Los puntos negros indican las celdas que representan el control negativo del equipo.

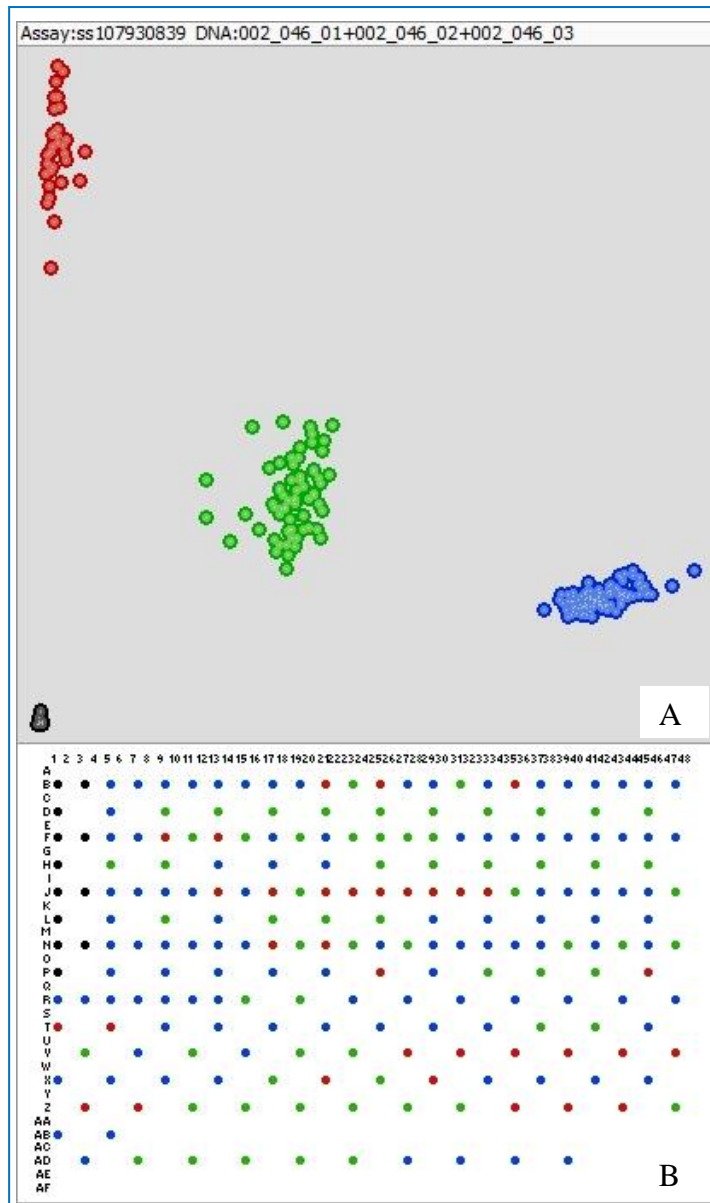


Figura 8. Salida de datos del programa PHERAstar Plus SNP para el marcador molecular polimórfico ss107930839 para todas las muestras de hoja evaluadas, tanto progenitores como primera generación filial. **A.** Gráfico de dos ejes (eje X alelo C y eje Y alelo T) que permite caracterizar las muestras como homocigota para uno de los alelos (puntos rojos alelo T, puntos azules alelo C) o heterocigota (puntos verdes); **B.** Muestras individualizadas e identificadas como homocigotas o heterocigotas en la placa de 1536 pocillos. Los puntos negros representan el control negativo del equipo.

Ib.3. Criterios de análisis para determinar que un individuo es heterocigota e híbrido de los progenitores usados en el cruzamiento

El análisis molecular del conjunto de 24 progenitores y sus respectivas F₁, detectó 146 SNP polimórficos sobre los 160 SNP totales evaluados (Tabla 8). En la misma Tabla 8 (Indicación*) se señalan los códigos de los referidos 146 SNP polimórficos para 24 progenitores. En este contexto, es oportuno señalar que el número de cebadores que resultaron polimórficos en el análisis particular de cada par de progenitores y su respectiva F₁ fue diferente o varió respecto al total de cebadores analizados originalmente.

Las Tablas 9A, 9B y 9C muestran además la tabulación y análisis de datos para determinar polimorfismos entre cada par de progenitores analizados y validar la dotación heterocigota e híbrida de sus respectivos individuos o filial F₁.

En el caso del cruzamiento **COD 258 (Ge(13) x Ge(4))** (Tabla 2) se analizaron los progenitores y dos plantas F₁ (COD 258-1 y COD 258-2) (Tabla 9A). El análisis realizado por SNP para detectar polimorfismos entre los progenitores selectos Ge(13) y Ge(4), indicó que de los 146 SNP polimórficos detectados en el análisis conjunto de los 24 progenitores evaluados, 55 SNP (37,67%) resultaron polimórficos (columna ^a, Tabla 9A) para este par de progenitores Ge(13) (R) y Ge(4) (S), reconociéndolos diferentes en la composición alélica de 55 de 146 locus analizados. Es oportuno destacar que solo el genotipo parental Ge(13) presentó cuatro locus con heterocigosis residual (Pierce, 2010) en la evaluación con estos 146 SNP.

En este contexto y en base a los 55 SNP que resultaron polimórficos entre los progenitores (columna ^a, Tabla 9A), se realizó el análisis comparativo de cada una de las filiales F₁. Los resultados indicaron que la planta F₁ COD 258-1 (columna ^b, Tabla 9A) no es un híbrido verdadero ya que no muestra ningún locus en estado heterocigota respecto a sus progenitores homocigotas. En el caso de la F₁ COD 258-2 (columna ^c, Tabla 9A), 55 marcadores (100%) de los 55 SNP polimórficos detectados entre los progenitores Ge(13) y Ge(4) (Indicación ^d, Tabla 9A), validaron a esta planta como un individuo F₁ **heterocigota e híbrido** de estos parentales. No obstante, esta planta F₁ registró 3 eventos de duplicación de un alelo parental o de “*gene conversión heterozygous genotypes*” (Ohta, 2010) (Indicación ^e, Tabla 9A).

Tabla 9A. Análisis del cruzamiento COD 258 (Ge(13) x Ge(4)), determinación de polimorfismos entre progenitores y validación de la dotación heterocigota e híbrida de los respectivos individuos F₁ respecto a su par de progenitores.

SNP ^a	Ge(13)	Ge(4)	F ₁ ^b	F ₁ ^c
			COD 258-1	COD 258-2
ss107912541	C:C ^{a1}	G:G	C:C ^e	G:C ^d
ss107912588	A:A	G:G	N/D	G:A
ss107912598	A:A ^{a2}	A:A	A:A	A:A ^e
ss107912619	A:A	G:G	A:A	G:A
ss107912624	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912650	T:T	A:A	T:T	T:A
ss107912743	A:A	T:T	A:A	T:A
ss107912776	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107912787	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912802	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912841	A:A	G:G	A:A	G:A
ss107912981	T:T	G:G	T:T	T:G
ss107913002	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913100	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913110	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913160	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913217	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913226	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913261	G:G	A:A	G:G	G:A
ss107913342	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913414	G:A	A:A	G:G	G:A
ss107913440	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913452	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913472	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913527	T:G ^f	G:G	G:G	T:G
ss107913529	T:T	A:A	T:T	T:A
ss107913582	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913658	A:A	G:G	A:A	G:A
ss107913705	A:A	C:C	A:A	C:A
ss107913707	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107913720	G:G	A:A	G:G	G:A
ss107913795	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913817	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913818	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107913888	C:C	A:A	C:C	C:A
ss107913925	T:T	T:T	T:T	T:C

SNP^a	Ge(13)	Ge(4)	F₁^b COD 258-1	F₁^c COD 258-2
ss107914208	A:A	T:T	A:A	T:A
ss107914377	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107914547	T:A	A:A	A:A	A:A
ss107914681	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107914779	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107914845	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107914846	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107915596	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107915613	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107915802	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107915919	T:C	T:T	T:T	T:T
ss107916198	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107916303	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107916822	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107916923	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107917285	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107917456	T:C	T:T	C:C	T:C
ss107917623	A:A	G:G	G:G	A:A ^g
ss107917765	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107917837	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107918096	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107918199	T:T	A:A	T:T	T:A
ss107918689	T:T	T:T	T:T	T:A
ss107918717	G:G	A:A	G:G	G:G
ss107918865	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107918912	C:C	G:G	C:C	G:C
ss107918951	A:A	A:A	A:A	T:A
ss107919246	C:C	A:A	C:C	C:C
ss107919507	T:T	T:T	T:T	C:C
ss107919731	A:A	T:T	A:A	T:A
ss107919814	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107919928	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107919964	G:G	T:T	G:G	T:G
ss107920109	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107920141	A:A	G:G	A:A	G:G
ss107920328	A:A	C:C	A:A	C:A
ss107920392	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107920473	A:A	C:C	A:A	C:A
ss107920602	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107920652	A:A	C:C	A:A	C:A
ss107920733	A:A	C:C	A:A	C:A

SNP^a	Ge(13)	Ge(4)	F₁^b COD 258-1	F₁^c COD 258-2
ss107921198	G:C	C:C	C:C	C:C
ss107921288	A:A	G:G	A:A	G:A
ss107921358	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921460	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921577	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921628	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107921710	A:A	C:C	A:A	C:A
ss107921721	T:T	C:C	C:C	C:C
ss107922581	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107922655	G:G	A:A	G:G	G:A
ss107922673	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107922775	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107922986	T:T	G:G	T:T	T:G
ss107923047	G:G	T:T	G:G	T:G
ss107923080	C:C	A:A	A:A	C:A
ss107923130	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107923139	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107923267	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107923460	T:T	G:G	T:T	T:G
ss107923556	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107923585	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107923799	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107923832	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107923892	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107924009	T:T	A:A	A:A	A:A
ss107924416	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107924669	T:T	G:G	T:T	T:G
ss107926274	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107926331	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107926354	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107926703	C:C	A:A	C:C	C:A
ss107926727	A:A	G:G	A:A	G:A
ss107926859	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107927145	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107927195	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107927719	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107927778	N/D	T:T	T:T	T:T
ss107927865	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107928020	G:G	G:G	A:A	G:A
ss107928136	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107928195	G:G	G:G	G:G	G:G

SNP ^a	Ge(13)	Ge(4)	F ₁ ^b COD 258-1	F ₁ ^c COD 258-2
ss107928522	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107928790	N/D	T:T	C:C	T:T
ss107928831	T:T	A:A	T:T	T:A
ss107928876	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107929088	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107929343	T:C	T:T	T:T	T:T
ss107929454	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107929468	C:C	T:T	T:T	T:C
ss107929516	G:C	C:C	G:G	G:C
ss107929517	C:C	A:A	C:C	C:A
ss107929602	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107929621	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107929868	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107929884	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107929998	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107930134	T:T	C:C	T:T	T:C
ss107930182	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107930839	C:C	T:T	C:C	T:C
ss107930879	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_02_10183206	T:T	T:T	T:T	T:T
GDM_02_8658796	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_14_2371113	T:T	C:C	T:T	T:C
GDM_14_2741218	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_03_5508521	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_03_5840155	A:A	G:G	A:A	G:A
GDM_03_7142133	A:A	A:A	A:A	A:A
GDM_13_28020561	C:C	C:C	C:C	C:C
GDM_18_60856147	C:C	C:C	C:C	C:C

^aCebadores de nucleótido único (SNP) para un conjunto de 24 progenitores, que incluyen aquellos polimórficos (p) ^{a1} y no polimórficos ^{a2} para el par de genotipos parentales Ge(13) y Ge(4).

^bPlanta F₁ COD 258-1.

^cPlanta F₁ COD 258-2.

^dCebador SNP polimórfico para planta F₁ COD 258-2.

^eCebadores SNP monomórficos para planta F₁ COD 258-1 y COD 258-2.

^fLocus heterocigota residual en el progenitor resistente Ge(13).

^gDuplicación de un alelo parental o “*gene conversión heterozygous genotypes*”.

Asimismo, la Tabla 9B presenta los datos del análisis para el cruzamiento **COD 157 (Ge(13) x Ge(12))** (Tabla 2) para reconocer aquellos SNP polimórficos entre los progenitores Ge(13)

(R) x Ge(12) (S) y posteriormente analizar dos plantas F₁ (COD 157-1 y COD 157-2) (columnas ^{abc}, Tabla 9B).

El análisis realizado por SNP para detectar polimorfismos entre los progenitores selectos Ge(13) y Ge(12), indicó que de los 146 SNP polimórficos detectados en el análisis conjunto de los 24 progenitores evaluados, sólo 33 SNP (22,60%) resultaron polimórficos (columna ^a, Tabla 9B) para diferenciar particularmente a este par de progenitores Ge(13) (R) y Ge(12) (S). Es oportuno destacar que cada genotipo parental presentó cuatro y tres locus con heterocigosis residual respectivamente (Pierce, 2010) en la evaluación con estos 146 SNP.

En este contexto y en base a los 33 SNP polimórficos entre los progenitores Ge(13) x Ge(12), se realizó el análisis comparativo de las F₁ (columnas ^{bc}, Tabla 9B). Se observó que 30 (90,91%) y 29 (87,88%) cebadores de los 33 SNP polimórficos para sus progenitores (Indicación ^d, Tabla 9B), validaron como heterocigotas e híbridas a las plantas F₁ COD-157-1 y COD-157-2, respectivamente. Es oportuno señalar que ambos individuos F₁ registraron además y, respectivamente, 8 y 7 eventos de duplicación de un alelo parental o de “*gene conversión heterozygous genotypes*” (Ohta, 2010) (Indicación ^e, Tabla 9B).

Tabla 9B. Análisis del cruzamiento COD 157 (Ge(13) x Ge(12)), determinación de polimorfismos entre progenitores y validación de la dotación heterocigota e híbrida de los respectivos individuos F₁ respecto a su par de progenitores.

SNP ^a	Ge(13)	Ge(12)	F ₁ ^b COD 157-1	F ₁ ^c COD 157-2
ss107912541	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912588	A:A ^{a1}	G:G	G:A ^d	G:A ^d
ss107912598	A:A	A:A	A:A ^e	A:A
ss107912619	A:A ^{a2}	A:A	A:A	A:A
ss107912624	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912650	T:T	A:A	T:A	T:A
ss107912743	A:A	T:T	T:A	T:A
ss107912776	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107912787	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912802	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107912841	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107912981	T:T	G:G	T:G	T:G
ss107913002	G:G	G:G	G:A	G:G

SNP ^a	Ge(13)	Ge(12)	F ₁ ^b COD 157-1	F ₁ ^c COD 157-2
ss107913100	A:A	T:T	T:A	T:A
ss107913110	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913160	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913217	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913226	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913261	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913342	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913414	G:A	A:A	G:A	G:A
ss107913440	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913452	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913472	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913527	T:G	T:G	T:G	T:G
ss107913529	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913582	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913658	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913705	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913707	C:C	T:T	C:C ^g	C:C ^g
ss107913720	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107913795	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107913817	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107913818	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107913888	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107913925	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107914208	A:A	N/D	A:A	A:A
ss107914377	C:C	A:A	C:C	C:C
ss107914547	T:A	A:A	A:A	A:A
ss107914681	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107914779	C:C	T:T	T:C	T:C
ss107914845	C:C	N/D	C:C	C:C
ss107914846	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107915596	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107915613	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107915802	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107915919	T:C ^f	C:C	T:C	T:C
ss107916198	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107916303	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107916822	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107916923	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107917285	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107917456	T:C	T:T	T:C	T:C
ss107917623	A:A	G:G	A:A	A:A

SNP^a	Ge(13)	Ge(12)	F₁^b COD 157-1	F₁^c COD 157-2
ss107917765	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107917837	T:T	G:G	T:G	T:G
ss107918096	T:T	C:C	T:C	T:C
ss107918199	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107918689	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107918717	G:G	A:A	G:G	G:G
ss107918865	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107918912	C:C	G:G	G:C	G:C
ss107918951	A:A	T:T	T:A	T:A
ss107919246	C:C	A:A	C:C	C:C
ss107919507	T:T	C:C	T:C	T:C
ss107919731	A:A	T:T	T:A	T:A
ss107919814	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107919928	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107919964	G:G	T:T	T:G	T:G
ss107920109	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107920141	A:A	G:G	G:G	G:G
ss107920328	A:A	C:C	C:A	C:A
ss107920392	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107920473	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107920602	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107920652	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107920733	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107921198	G:C	G:G	G:C	G:C
ss107921288	A:A	A:A	G:A	A:A
ss107921358	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921460	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921577	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107921628	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107921710	A:A	C:C	C:A	C:A
ss107921721	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107922581	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107922655	G:G	A:A	G:A	G:A
ss107922673	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107922775	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107922986	T:T	T:T	T:G	T:G
ss107923047	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107923080	C:C	C:C	C:A	A:A
ss107923130	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107923139	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107923267	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107923460	T:T	G:G	T:G	T:G

SNP^a	Ge(13)	Ge(12)	F₁^b COD 157-1	F₁^c COD 157-2
ss107923556	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107923585	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107923799	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107923832	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107923892	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107924009	T:T	T:T	T:A	T:A
ss107924416	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107924669	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107926274	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107926331	C:C	T:T	T:C	T:C
ss107926354	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107926703	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107926727	A:A	G:A ^f	A:A	A:A
ss107926859	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107927145	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107927195	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107927719	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107927778	N/D	T:T	T:T	T:T
ss107927865	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107928020	G:G	A:A	A:A	A:A
ss107928136	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107928195	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107928522	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107928790	N/D	C:C	T:C	T:C
ss107928831	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107928876	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107929088	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107929343	T:C	C:C	T:C	T:C
ss107929454	G:G	A:A	G:A	G:A
ss107929468	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107929516	G:C	G:G	G:G	G:G
ss107929517	C:C	A:A	C:C	C:C
ss107929602	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107929621	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107929868	G:G	G:G	G:G	G:G
ss107929884	A:A	A:A	A:A	A:A
ss107929998	T:T	T:T	T:T	T:T
ss107930134	T:T	T:C	T:T	T:T
ss107930182	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107930839	C:C	C:C	C:C	C:C
ss107930879	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_02_10183206	T:T	T:T	T:T	T:T

SNP ^a	Ge(13)	Ge(12)	F ₁ ^b COD 157-1	F ₁ ^c COD 157-2
GDM_02_8658796	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_14_2371113	T:T	T:T	T:T	T:T
GDM_14_2741218	G:G	C:G	G:G	G:G
GDM_03_5508521	G:G	G:G	G:G	G:G
GDM_03_5840155	A:A	G:G	A:A	A:A
GDM_03_7142133	A:A	A:A	A:A	A:A
GDM_13_28020561	C:C	C:C	C:C	C:C
GDM_18_60856147	C:C	C:C	C:C	C:C

^aCebadores de nucleótido único (SNP) para un conjunto de 24 progenitores, que incluyen aquellos polimórficos (p)^{a1} y no polimórficos^{a2} para el par de genotipos parentales Ge(13) y Ge(12).

^bPlanta F₁ COD 157-1.

^cPlanta F₁ COD 157-2.

^dCebador SNP polimórfico para plantas F₁ COD 157-1 y COD 157-2.

^eCebador SNP monomórfico para plantas F₁ COD 157-1 y COD 157-2.

^fLocus heterocigota residual en uno o ambos progenitores.

^gDuplicación de un alelo parental o “*gene conversión heterozygous genotypes*”.

En el caso del cruzamiento **COD 172 (Ge(9) x Ge(16))** (Tabla 2) se analizaron los progenitores y una plantas F₁ **COD 172-1** (Tabla 9C).

El análisis realizado por SNP para detectar polimorfismos entre los progenitores selectos Ge(9) (R) y Ge(16) (S) indicó que de los 146 SNP polimórficos detectados en el análisis conjunto de los 24 progenitores evaluados, 68 SNP (46,57%) resultaron polimórficos para diferenciar particularmente a este par de progenitores Ge(9) y Ge(16). Es oportuno destacar que los dos progenitores de ese cruzamiento no presentaron locus con heterocigosis residual (Pierce, 2010) en la evaluación realizada con estos 146 SNP.

En este contexto y en base a los 68 SNP polimórficos detectados para los progenitores, 57 SNP (83,82%) validaron a esta planta F₁ (COD 172-1) como individuo heterocigota e híbrido de los progenitores Ge(9) y Ge(16); observándose además que esta F₁ registró 7 eventos de duplicación de un alelo parental o de “*gene conversión heterozygous genotypes*” (Otha, 2010) (Indicación^e, Tabla 9C).

Tabla 9C. Análisis del cruzamiento COD 172 (Ge(9) x Ge(16)), determinación de polimorfismos entre progenitores y validación de la dotación heterocigota e híbrida de los respectivos individuos F₁ respecto a su par de progenitores.

SNP ^a	Ge(9)	Ge(16)	F ₁ ^b COD 172-1
ss107912541	C:C ^{a1}	G:G	G:C ^c
ss107912588	G:G	G:G	G:G ^d
ss107912598	A:A ^{a2}	A:A	A:A
ss107912619	G:G	G:G	G:G
ss107912624	T:T	C:C	T:C ^c
ss107912650	A:A	T:T	T:A
ss107912743	T:T	A:A	T:A
ss107912776	A:A	G:G	G:A
ss107912787	C:C	C:C	C:C
ss107912802	C:C	C:C	C:C
ss107912841	A:A	A:A	G:A
ss107912981	G:G	T:T	T:G
ss107913002	G:G	A:A	G:A
ss107913100	A:A	T:T	T:A
ss107913110	G:G	G:G	G:G
ss107913160	G:G	C:C	G:G
ss107913217	G:G	G:G	G:G
ss107913226	G:G	G:G	G:G
ss107913261	G:G	A:A	G:A
ss107913342	A:A	A:A	A:A
ss107913414	A:A	A:A	A:A
ss107913440	A:A	A:A	A:A
ss107913452	T:T	T:T	T:T
ss107913472	T:T	G:G	T:G
ss107913527	T:T	T:T	T:G
ss107913529	T:T	T:T	T:A
ss107913582	A:A	A:A	A:A
ss107913658	A:A	G:G	G:A
ss107913705	A:A	C:C	C:A
ss107913707	C:C	C:C	C:C
ss107913720	G:G	A:A	A:A ^e
ss107913795	A:A	T:T	T:A
ss107913817	T:T	T:T	T:T
ss107913818	C:C	T:T	T:C
ss107913888	C:C	A:A	C:A
ss107913925	T:T	T:T	T:T
ss107914208	A:A	T:T	T:A

SNP^a	Ge(9)	Ge(16)	F₁^b COD 172-1
ss107914377	C:C	C:C	C:C
ss107914547	A:A	T:T	A:A
ss107914681	C:C	T:T	C:C
ss107914779	T:T	T:T	T:T
ss107914845	C:C	T:T	C:C
ss107914846	T:T	T:T	T:C
ss107915596	T:T	G:G	T:G
ss107915613	G:G	G:G	G:G
ss107915802	A:A	A:A	A:A
ss107915919	T:T	C:C	T:C
ss107916198	C:C	C:C	C:C
ss107916303	G:G	G:G	G:A
ss107916822	A:A	G:G	A:A
ss107916923	G:G	G:G	G:G
ss107917285	G:G	T:T	T:G
ss107917456	T:T	T:T	T:T
ss107917623	G:G	G:G	G:G
ss107917765	C:C	A:A	C:A
ss107917837	T:T	T:T	T:T
ss107918096	C:C	T:T	T:C
ss107918199	T:T	A:A	T:A
ss107918689	T:T	A:A	T:T
ss107918717	G:G	G:G	G:G
ss107918865	A:A	T:T	T:A
ss107918912	C:C	G:G	G:C
ss107918951	T:T	A:A	A:A
ss107919246	A:A	A:A	A:A
ss107919507	C:C	T:T	T:C
ss107919731	A:A	T:T	T:A
ss107919814	C:C	T:T	T:C
ss107919928	T:T	T:T	T:T
ss107919964	G:G	T:T	T:G
ss107920109	A:A	A:A	A:A
ss107920141	G:G	G:G	G:G
ss107920328	C:C	C:C	C:C
ss107920392	C:C	T:T	T:C
ss107920473	A:A	A:A	A:A
ss107920602	G:G	G:G	G:G
ss107920652	A:A	A:A	A:A
ss107920733	C:C	C:C	C:C
ss107921198	C:C	C:C	C:C

SNP^a	Ge(9)	Ge(16)	F₁^b COD 172-1
ss107921288	G:G	G:G	G:G
ss107921358	T:T	T:T	T:T
ss107921460	T:T	T:T	T:T
ss107921577	T:T	T:T	T:T
ss107921628	G:G	G:G	G:G
ss107921710	C:C	C:C	C:C
ss107921721	C:C	T:T	T:T
ss107922581	T:T	T:T	T:T
ss107922655	G:G	A:A	G:A
ss107922673	A:A	T:T	T:A
ss107922775	T:T	C:C	T:C
ss107922986	T:T	T:T	T:T
ss107923047	T:T	T:T	T:T
ss107923080	A:A	C:C	C:A
ss107923130	T:T	T:T	T:T
ss107923139	C:C	C:C	C:C
ss107923267	T:T	T:T	T:T
ss107923460	T:T	G:G	T:G
ss107923556	A:A	A:A	A:A
ss107923585	C:C	T:T	T:C
ss107923799	G:G	G:G	G:G
ss107923832	A:A	A:A	A:A
ss107923892	T:T	A:A	T:A
ss107924009	A:A	A:A	A:A
ss107924416	T:T	C:C	T:C
ss107924669	T:T	G:G	T:G
ss107926274	C:C	T:T	T:C
ss107926331	C:C	C:C	C:C
ss107926354	G:G	G:G	G:G
ss107926703	C:C	C:C	C:C
ss107926727	A:A	G:G	G:A
ss107926859	C:C	T:T	T:C
ss107927145	G:G	A:A	G:G
ss107927195	G:G	G:G	G:G
ss107927719	T:T	T:T	T:T
ss107927778	A:A	T:T	T:T
ss107927865	T:T	T:T	T:T
ss107928020	G:G	A:A	G:A
ss107928136	C:C	G:G	G:C
ss107928195	G:G	G:G	G:G
ss107928522	T:T	C:C	T:C

SNP ^a	Ge(9)	Ge(16)	F ₁ ^b COD 172-1
ss107928790	C:C	T:T	T:C
ss107928831	T:T	A:A	T:A
ss107928876	T:T	T:T	T:T
ss107929088	C:C	C:C	C:C
ss107929343	T:T	C:C	T:C
ss107929454	G:G	G:G	G:G
ss107929468	T:T	C:C	T:C
ss107929516	G:G	C:C	G:C
ss107929517	C:C	A:A	C:A
ss107929602	A:A	G:G	G:A
ss107929621	T:T	C:C	T:C
ss107929868	G:G	A:A	G:A
ss107929884	A:A	A:A	A:A
ss107929998	C:C	C:C	C:C
ss107930134	T:T	T:T	T:T
ss107930182	C:C	G:G	G:C
ss107930839	C:C	T:T	T:C
ss107930879	G:G	G:G	G:G
GDM_02_10183206	T:T	T:T	T:T
GDM_02_8658796	G:G	G:G	G:G
GDM_14_2371113	T:T	C:C	T:C
GDM_14_2741218	G:G	C:C	G:G
GDM_03_5508521	G:G	G:G	G:G
GDM_03_5840155	G:G	G:G	G:G
GDM_03_7142133	A:A	A:A	A:A
GDM_13_28020561	C:C	C:C	C:C
GDM_18_60856147	C:C	C:C	C:C

^aCebadores de nucleótido único (SNP) para un conjunto de 24 progenitores, que incluyen aquellos polimórficos (p) ^{a1} y no polimórficos ^{a2} para el par de genotipos progenitores Ge(16) y Ge(9).

^bPlanta F₁ COD 172-1.

^cCebadores SNP polimórficos para planta F₁ COD 172-1.

^dCebador SNP monomórfico para planta F₁ COD 172-1.

^eDuplicación de un alelo parental o “*gene conversión heterozygous genotypes*”.

En base a la información presentada en los casos ejemplificados (Tablas 9A, 9B, 9C) se obtuvo la siguiente Tabla 10 que resume y señala cuáles individuos F₁ fueron validados molecularmente por SNP.

La Tabla 10 indica el número de plantas F₁ sobrevivientes (n= 160), sus respectivos progenitores y cruzamientos de origen considerados efectivos por marcadores morfológicos y estructurales (histológicos) y fértiles en el periodo 2015/16, como además señala (*con color*), aquellas plantas F₁ cuya dotación heterocigota como además su condición híbrida fue validada con certeza (Tablas 9A, 9B y 9C) utilizando estos marcadores moleculares SNP.

Tabla 10. Total de 160 individuos F₁, sus progenitores y cruzamientos de origen, que fueron evaluados por marcadores moleculares SNP (de sus siglas en inglés, Polimorfismo de Nucleótido Único). Señalando además (en celeste) aquellos individuos cuya dotación heterocigota e identidad F₁ fue validada molecularmente.

Código de siembra de semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Número y Código de plantas F ₁ sobrevivientes	Híbrido molecular por MM-SNP y nro. de MM polimórficos
Cruzamientos RxS			
COD 147	Ge(5) x Ge(18)	COD 147-1	no
COD 148	Ge(5) x Ge(12)	COD 148-1 COD 148-2	si (38/42) si (38/42)
COD 149/249	Ge(5) x Ge(4)	COD 149-2 COD 249-1	no si (54/60)
COD 151	Ge(5) x Ge(10)	COD 151-1 COD 151-2	no no
COD 152	Ge(8) x Ge(18)	COD 152-1 COD 152-2 COD 252-1	no no no
COD 153/253	Ge(8) x Ge(12)	COD 153-1 COD 253-1 COD 253-2	no no no
COD 154	Ge(8) x Ge(10)	COD 154-1 COD 154-2 COD 154-3	no no no
COD 155	Ge(13) x Ge(18)	COD 155-1 COD 155-2 COD 155-3	si (26/53) no no
COD 156	Ge(13) x Ge(15)	COD 156-1 COD 156-2	no no
COD 157*/257	Ge(13) x Ge(12)	COD 157-1 COD 157-2 COD 257-1	si (30/33) si (29/33) si (23/33)

Código de siembra de semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Número y Código de plantas F ₁ sobrevivientes	Híbrido molecular por MM-SNP y nro. de MM polimórficos
Cruzamientos RxS			
COD 258*	Ge(13) x Ge(4)	COD 258-1	no
		COD 258-2	si (55/55)
COD 159/259	Ge(13) x Ge(14)	COD 159-1	no
		COD 159-2	no
		COD 259-1	no
COD 160	Ge(13) x Ge(20)	COD 160-1	si (46/51)
COD 161	Ge(13) x Ge(16)	COD 161-1	no
		COD 161-2	no
		COD 161-3	si (28/62)
COD 162	Ge(6) x Ge(18)	COD 162-1	si (33/60)
		COD 162-2	si (33/60)
		COD 162-3	si (33/60)
COD 163	Ge(6) x Ge(15)	COD 163-1	si (30/49)
		COD 163-2	si (30/49)
		COD 163-3	si (27/49)
COD 164	Ge(6) x Ge(12)	COD 164-1	no
		COD 164-2	no
COD 165	Ge(6) x Ge(4)	COD 165-1	si (31/49)
		COD 165-2	si (30/49)
		COD 165-3	si (30/49)
COD 166	Ge(6) x Ge(10)	COD 166-1	no
		COD 166-2	no
		COD 166-3	no
COD 167	Ge(6) x Ge(20)	COD 167-1	si (32/57)
		COD 167-2	si (32/57)
COD 168	Ge(6) x Ge(25)	COD 168-1	no
		COD 168-2	si (34/61)
		COD 168-3	si (35/61)
COD 169	Ge(9) x Ge(18)	COD 169-1	no
		COD 169-2	no
		COD 169-3	si (38/41)
COD 170	Ge(9) x Ge(12)	COD 170-2	si (23/29)
COD 171	Ge(9) x Ge(20)	COD 171-1	si (40/47)
		COD 171-2	no
COD 172	Ge(9) x Ge(16)	COD 172-1	si (57/68)
COD 173	Ge(19) x Ge(18)	COD 173-1	no
		COD 173-2	si (28/48)
		COD 173-3	si (28/48)

Código de siembra de semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Número y Código de plantas F ₁ sobrevivientes	Híbrido molecular por MM-SNP y nro. de MM polimórficos
Cruzamientos RxS			
COD 174	Ge(19) x Ge(15)	COD 174-1 COD 174-2	no no
COD 175	Ge(19) x Ge(4)	COD 175-1 COD 175-2 COD 175-3	si (26/52) si (26/52) si (26/52)
COD 176	Ge(19) x Ge(14)	COD 176-1 COD 176-2 COD 176-3	no no no
COD 177	Ge(19) x Ge(25)	COD 177-1 COD 177-2 COD 177-3	si (51/59) si (51/59) si (51/59)
COD 178	Ge(19) x Ge(26)	COD 178-1 COD 178-2 COD 178-3	si (39/59) si (39/59) si (39/59)
COD 179	Ge(19) x Ge(16)	COD 179-1 COD 179-2 COD 179-3	si (33/61) si (33/61) si (33/61)
COD 180	Ge(23) x Ge(15)	COD 180-1	si (60/65)
		COD 180-2	no
		COD 180-3	si (60/65)
COD 181	Ge(23) x Ge(4)	COD 181-1	si (47/52)
		COD 181-2	si (42/52)
COD 182	Ge(23) x Ge(14)	COD 182-1	si (54/59)
		COD 182-2	si (52/59)
COD 183	Ge(23) x Ge(25)	COD 183-1	no
		COD 183-2	no
		COD 183-3	no
COD 184	Ge(23) x Ge(26)	COD 184-1	si (42/347)
		COD 184-2	si (43/47)
COD 185	Ge(23) x Ge(16)	COD 185-1	si (58/66)
		COD 185-2	si (58/66)
		COD 185-3	no
COD 186	Ge(24) x Ge(15)	COD 186-1	si (46/51)
		COD 186-2	si (45/51)
		COD 186-3	si (44/51)
COD 187	Ge(24) X Ge(14)	COD 187-1	si (43/50)
		COD 187-2	si (44/50)
		COD 187-3	si (44/50)

Código de siembra de semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Número y Código de plantas F ₁ sobrevivientes	Híbrido molecular por MM-SNP y nro. de MM polimórficos
Cruzamientos RxS			
COD 188	Ge(24) x Ge(20)	COD 188-1	si (46/53)
		COD 188-2	si (47/53)
		COD 188-3	si (47/53)
COD 189	Ge(24) x Ge(26)	COD 189-1	si (53/59)
		COD 189-2	no
		COD 189-3	si (52/59)
COD 190	Ge(24) x Ge(16)	COD 190-1	si (42/49)
		COD 190-2	si (41/49)
		COD 190-3	si (40/49)
COD 191	Ge(17) x Ge(14)	COD 191-1	si (48/66)
COD 192	Ge(17) x Ge(20)	COD 192-1	no
		COD 192-2	si (44/65)
		COD 192-3	no
COD 193	Ge(17) x Ge(26)	COD 193-1	si (43/63)
		COD 193-2	si (56/63)
Cruzamientos RxR			
COD 194	Ge(5) x Ge(8)	COD 194-1	no
		COD 194-2	no
		COD 194-3	no
COD 195	Ge(5) x Ge(13)	COD 195-1	no
		COD 195-2	no
		COD 195-3	no
COD 196	Ge(5) x Ge(6)	COD 196-1	no
		COD 196-2	no
		COD 196-3	no
COD 197	Ge(5) x Ge(9)	COD 197-1	no
		COD 197-2	no
		COD 197-3	si (41/44)
COD 198	Ge(5) x Ge(19)	COD 198-1	no
		COD 198-2	no
		COD 198-3	no
COD 199	Ge(8) x Ge(13)	COD 199-1	no
COD 200	Ge(8) x Ge(6)	COD 200-1	no
		COD 200-2	no
COD 201	Ge(8) x Ge(9)	COD 201-1	no
COD 202	Ge(8) x Ge(19)	COD 202-1	no
		COD 202-2	no

Código de siembra de semillas F ₁	Cruzamiento de origen	Número y Código de plantas F ₁ sobrevivientes	Híbrido molecular por MM-SNP y nro. de MM polimórficos
Cruzamientos RxR			
COD 203	Ge(13) x Ge(6)	COD 203-1	no
		COD 203-2	no
		COD 203-3	no
COD 204	Ge(13) x Ge(9)	COD 204-1	no
		COD 204-2	no
		COD 204-3	no
COD 205	Ge(13) x Ge(19)	COD 205-1	no
		COD 205-2	si (29/47)
		COD 205-3	si (28/47)
COD 206	Ge(6) x Ge(9)	COD 206-1	no
		COD 206-2	si (41/43)
		COD 206-3	no
COD 207	Ge(6) x Ge(19)	COD 207-1	no
		COD 207-2	no
		COD 207-3	si (27/64)
COD 208	Ge(9) x Ge(19)	COD 208-1	no
		COD 208-2	no
		COD 208-3	no
COD 209	Ge(23) x Ge(24)	COD 209-1	si (26/26)
		COD 209-2	si (25/26)
COD 210	Ge(23) x Ge(17)	COD 210-1	no
COD 211	Ge(24) x Ge(17)	COD 211-1	si (47/64)
		COD 211-2	si (53/64)
		COD 211-3	no

*Individuos F₁ verificados por controles morfológicos, histológicos y moleculares continuados en el marco de la tesis.

Los resultados fueron obtenidos en base a criterios morfológicos, estructurales (histológicos, marca-cicatriz) y moleculares rigurosos que permitieron definir con certeza cuáles poblaciones avanzarían en el proceso de selección y avance generacional del material en estudio para evaluar la reacción y tipo de herencia de genes *Rdc* para *CTS-Dpc*. De esta manera, sólo aquellas semillas F₂, obtenidas de plantas F₁ definidas efectivas morfológica y estructuralmente, validadas molecularmente como *heterocigotas e híbridas* por SNP y productoras de cantidad suficiente de semillas F₂ (n ≥ 40-50 semillas) fueron continuadas para avanzar hacia las poblaciones segregantes F₂ y F₃. En este contexto, sólo 9 plantas F₁ derivadas de cruzamientos RxR fueron validadas molecularmente y tuvieron la posibilidad de

continuar y avanzar en las siguientes poblaciones segregantes, pero dependiendo todavía de la producción y disponibilidad de suficiente semilla F₂.

La producción de semillas adicionó otro factor limitante que condicionó y redujo aun más el número de poblaciones factibles de continuar el proceso de evaluación y selección de generaciones segregantes, en el marco de programas cuyo objetivo sea obtener resultados representativos y rigurosos.

IIb. DISCUSIÓN PARCIAL

Dada la escasa variabilidad o base genética limitada en el germoplasma de soja, producto del proceso sostenido de selección y mejora (Da Silva et al., 2017), los descriptores morfológicos suelen no ser diferenciales o polimórficos entre los progenitores seleccionados en este caso para R/S a CTS causada por *Dpc*. En el presente estudio varios pares de progenitores no eran polimórficos para los caracteres morfológicos evaluados, resultando insuficientes o de valor limitado. Además, en trabajos anteriores se ha observado una ligera capacidad de respuesta de estos marcadores a las condiciones ambientales (Hartwig y Hinson, 1962; Perry y McIntosh, 1991; Yan et al., 2014). Por ello, los marcadores moleculares surgen como una herramienta biotecnológica complementaria que provee robustez al proceso de selección de plantas (Selección Asistida por Marcadores, de sus siglas en inglés *Marker Assisted Selection* -MAS-). Los marcadores analizados en progenitores y descendencias son estables en el tiempo y reproducibles, ya que no están influenciados por el ambiente, pudiendo además utilizarse en cualquier estadio vegetal (Unêda-Trevisoli et al., 2017). Cada año, surgen diferentes técnicas moleculares y nuevas estrategias de análisis para proporcionar una mayor solidez a este proceso. Los marcadores de ADN se pueden clasificar en dos categorías, según cómo se revele el polimorfismo: polimorfismos basados en hibridación y polimorfismos de PCR. Entre estos últimos se enumeran los marcadores de tipo Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (de sus siglas en inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism* -AFLP-), Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (de sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism* -RFLP-), microsatélites (de sus siglas en inglés, *Simple Sequence Repeat* -SSR-) y SNP (Bhering et al., 2017).

Los marcadores de tipo SNP son la clase más moderna y específica de marcadores moleculares hasta la fecha. Los SNP son muy frecuentes en el genoma de la planta, pudiendo encontrarse un SNP cada 100-300 pb, o menos, según la especie (Kravczak, 1999). Por ello, diversos tipos de marcadores moleculares fueron aplicados para identificar individuos heterocigotas y homocigotas en poblaciones segregantes más avanzadas (Yoon et al., 2007; Semagn et al., 2014; Unêda-Trevisoli et al., 2017). De todos modos, debe tenerse en cuenta que no es aconsejable el reemplazo de un tipo de marcador por otro durante el proceso de mejora. De acuerdo al trabajo realizado por Giancola (1998), la información que se obtuvo de los marcadores morfológicos y moleculares (para ese caso en estudio, AFLP, RAPD y SSR), resultaron ser distintas, ofreciendo información complementaria a la caracterización morfológica. Otro de los pasos más importantes para el uso correcto de los marcadores moleculares ha sido el establecimiento de la relación entre un marcador determinado y un locus de interés. En ese contexto, los marcadores deberían ser específicos para cada cruzamiento evaluado (Bhering et al., 2017).

En base a la importancia y avances logrados por la aplicación de estas herramientas biotecnológicas al mejoramiento vegetal, es que en el marco de esta tesis se propuso la *aplicación temprana e innovadora* de marcadores moleculares específicos para *realizar la caracterización de la primera filial*, esto es la F_1 , permitiendo hacer más eficiente el proceso de selección desde el inicio del trabajo de mejoramiento en soja.

Respecto al tipo de MM codominantes utilizado, la dotación genética (alélica) de la totalidad de los progenitores fue analizado y las respectivas filiales F_1 fueron fehacientemente determinadas como individuos heterocigotas e híbridos, a través de 160 cebadores de los cuales 146 SNP resultaron polimórficos para los 24 progenitores evaluados. Mientras que al analizar cada par de progenitores y sus F_1 , se observó que el número y proporción de cebadores polimórficos respecto al total de 146 fue variable y particular para cada caso.

Al analizar la caracterización molecular por SNP de cada par de progenitores se obtuvo información sobre tres aspectos interesantes de abordar: el grado de polimorfismo entre progenitores, la heterocigosis residual (Pierce, 2010) y la conversión de un alelo hacia uno de los progenitores (Otha, 2010) o efecto materno.

Respecto al *grado de polimorfismo* detectado entre progenitores surge que el germoplasma de Ge(13) está más relacionado o emparentado con el genotipo Ge(12) (Tabla 9B) que con el

fondo genético del cultivar Ge(4) (Tabla 9A). Mientras que los genotipos más divergentes resultaron ser los cultivares estabilizados Ge(16) y Ge(9) (Tabla 9C).

En relación a la *heterocigosis residual detectada en los progenitores* a través de los loci caracterizados por los SNP polimórficos para 24 progenitores, se observó que los 3 genotipos Ge(4), Ge(16) y Ge(9) que son cultivares estabilizados y usados en diversos programas de mejoramientos no presentaron locus en estado de heterocigosis residual (Tablas 9A y 9C). Mientras que los genotipos Ge(13) y Ge(12) registraron 4 y 3 eventos de heterocigosis residual respectivamente (Tabla 9B), posiblemente debido a que son líneas experimentales aun no estabilizadas para algunos loci de su genoma.

Asimismo, al caracterizar los individuos F₁ se observó una proporción de loci no heterocigotas, que duplican alguno de los alelos de uno de los progenitores (Tablas 9A, 9B, 9C); aunque en este estudio se observaron en mayor proporción aquellos loci similares al progenitor materno (efecto materno, coincidente con lo expuesto por Fehr y col. (1992) y Dhaubhadel y col. (2003)). Otros autores explican estos eventos como resultantes de un proceso de *gene conversion heterozygous genotypes* (Otha, 2010).

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la aplicación adicional y complementaria de marcadores moleculares combinados con los controles clásicos (morfológicos y estructurales-histológicos), aportan rigurosidad e información adicional de relevancia sobre cada uno de los progenitores involucrados en los cruzamientos que enriquecen y fortalecen los resultados y su significado biológico. No obstante, es oportuno señalar que este mismo protocolo generó simultáneamente una significativa reducción de la diversidad, respecto a aquellas numerosas combinaciones originales, y sus respectivos cruzamientos RxS, RxR y sus recíprocos (Tabla 5).

ACTIVIDADES DESARROLLADAS PARA CUMPLIR EL OE.1c:

Avanzar en el desarrollo de poblaciones segregantes F_2 y sus respectivas F_3 y familias $F_{2:3}$ a partir de individuos heterocigotas (F_1) validados molecularmente.

El tipo de MM codominante usado (SNP) permitió detectar y distinguir los perfiles polimórficos de los progenitores y observarlos fehacientemente en las respectivas filiales F_1 , verificando su dotación heterocigota e híbrida. En el marco de esta tesis, la aplicación temprana de marcadores moleculares específicos SNP ha permitido *validar la dotación genética de la primera filial, F_1* , y sus respectivos progenitores haciendo más eficiente el proceso de selección y mejoramiento en soja en la búsqueda de resistencia a la CTS-*Dpc* y otras enfermedades de origen biótico.

IIc. MATERIALES Y MÉTODOS

IIc.1. Obtención de semillas de la segunda generación filial (F_2) a partir de individuos F_1

La totalidad de las plantas F_1 provenientes del ensayo descrito en el **Capítulo II, Sección IIb.1**, que habían sido evaluadas y verificadas por marcadores morfológicos y control estructural o histológico (marca-cicatriz), se cosecharon manualmente en estadio R7-R8 (marzo-abril 2016) obteniendo las respectivas vainas y semillas F_2 . Las semillas F_2 fueron rotuladas y guardadas en sobres de papel a 4°C hasta su utilización y previa verificación molecular de la heterocigosis de sus respectivas F_1 .

De todos los plántulos de semillas F_2 , sólo aquellos provenientes de individuos F_1 heterocigotas validados molecularmente (Tabla 10), fueron continuados y avanzados a las siguientes generaciones (Peruzzo et al., 2017c; 2017d).

IIc.2. Obtención de semillas de la tercera generación filial (F_3) a partir de individuos F_2 descendientes de padres F_1 (heterocigotas) validados molecularmente por SNP

El avance en la obtención de generaciones segregantes F_3 se realizó en base a la selección de aquellas semillas F_2 descendientes o producidas a partir de plantas F_1 efectivas, validadas en base a criterios morfológicos, estructurales y moleculares por cebadores SNP. Con estos

criterios de validación, en septiembre de 2016, se sembraron entre 32 y 100 semillas de cada plantel F₂ (según disponibilidad) originadas a partir de progenitores, cruzamientos y combinaciones (RxS, RxR y recíprocos) considerados relevantes desde el punto de vista agronómico como fundamentalmente para dar respuesta al objetivo general de este estudio (Tabla 5). La selección se realizó, además, considerando la disponibilidad de espacio bajo invernadero y adaptado a la posibilidad de seguimiento y manejo del ciclo de producción de plantas y semillas.

A continuación se presenta la nómina de los planteles de semillas F₂ seleccionados y sembrados para obtener semillas F₃, su correspondiente código de identidad, los progenitores y cruzamiento de origen (Tabla 11):

Tabla 11. Planteles de semillas F₂ seleccionados y sembrados para obtener semillas F₃, su correspondiente código de identidad, los progenitores y cruzamiento de origen.

Semillas F₂ provenientes de cruzamientos RxS	
COD 148-1 y 2	progenitores Ge(5)xGe(12)
COD 249-1	progenitores Ge(5)xGe(4)
COD 155-1	progenitores Ge(13)xGe(18)
COD 157-1 y 2	progenitores Ge(13)xGe(12)
COD 258-2	progenitores Ge(13)xGe(4)
COD 160-1	progenitores Ge(13)xGe(20)
COD 161-3	progenitores Ge(13)xGe(16)
COD 162-1 y 2	progenitores Ge(6)xGe(18)
COD 163-2	progenitores Ge(6)xGe(15)
COD 165-1	progenitores Ge(6)xGe(4)
COD 168-2	progenitores Ge(6)xGe(25)
COD 169-3	progenitores Ge(9)xGe(18)
COD 170-2	progenitores Ge(9)xGe(12)
COD 171-1	progenitores Ge(9)xGe(20)
COD 172-1	progenitores Ge(9)xGe(16)
COD 173-2	progenitores Ge(19)xGe(18)

Semillas F₂ provenientes de cruzamientos RxS	
COD 175-1	progenitores Ge(19)xGe(4)
COD 193-2	progenitores Ge(17)xGe(26)
Semillas F₂ provenientes de cruzamientos RxR	
COD 197-3	progenitores Ge(5)xGe(9)
COD 205-2	progenitores Ge(13)xGe(19)
COD 206-2	progenitores Ge(6)xGe(9)

En esta oportunidad, para la siembra se utilizaron bandejas plantineras biodegradables de 25 pocillos (25 x 25 cm²), donde se ubicaron dos semillas F₂ por pocillo, con una mezcla 2:1 de suelo/vermiculita hasta emergencia y cotiledones expandidos (Fig. 10A). Los planteles de siembra fueron colocados en un invernadero de material y cobertura plástica con sistema de apertura y aireación semi-controladas. El desarrollo de las plantas se mantuvo bajo condiciones de alternancia de 16 h de luz y 8 h de oscuridad bajo temperatura diurna-nocturna de 25 ± 10 °C (Fig. 10B). El trasplante se realizó a macetas de 1L y con criterio similar al descrito anteriormente (Fig. 10C). El ciclo vegetativo se desarrolló en iguales condiciones hasta alcanzar el reproductivo (Fig. 10D).

La cosecha e identificación de vainas y semillas F₃ se realizó manualmente de acuerdo a lo descrito para anteriores cosechas de poblaciones segregantes. Se preservó la identidad de las semillas F₃ obtenidas a partir de cada planta o individuo segregante F₂.



Figura 10. Producción de semilla de la tercer generación filial (F_3) en invernadero de material y cobertura plástica con sistema de apertura y aireación semi-controladas. **A.** Siembra inicial en plantineras biodegradables; **B.** Desarrollo de plántulas en invernadero; **C.** Transplante de plántulas a macetas; **D.** Desarrollo de plantas en invernadero. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias ($33^{\circ}01'LS$ y $60^{\circ}53'LO$), en el periodo 2016.

La cosecha e identificación de vainas y semillas F_3 se realizó manualmente de acuerdo a lo descrito para anteriores cosechas de poblaciones segregantes. Se preservó la identidad de las semillas F_3 obtenidas a partir de cada planta o individuo segregante F_2 .

IIC. RESULTADOS

IIC.1. Obtención de semillas de la segunda generación filial (F₂) a partir de individuos F₁

La Tabla 12 muestra el número de semillas F₂ obtenidas en marzo-abril de 2016 a partir de la multiplicación controlada de las respectivas semillas F₁ sembradas en 2015. La cosecha incluye todas las plantas F₁ sembradas previamente a la caracterización molecular de individuos F₁ y sus respectivos progenitores (junio 2016), destacando aquellas que fueron heterocigotas por marcadores moleculares SNP.

Luego, y en base a los resultados moleculares, sólo se continuó en el avance generacional de aquellas semillas F₂ obtenidas de individuos heterocigotas validados.

Tabla 12. Cruzamiento de procedencia de plantas F₁ y número de semillas F₂ producidas, discriminando entre aquellas validadas por marcadores moleculares de tipo SNP (celdas coloreadas de celeste).

Código planta F ₁	Nro. de semillas F ₂ obtenidas
Cruzamientos RxS	
COD 147-1	80
COD 148-1	77
COD 148-2	32
COD 149-2	43
COD 249-1	68
COD 151-1	48
COD 151-2	46
COD 152-1	46
COD 152-2	35
COD 152-3	6
COD 153-1	18
COD 253-1	14
COD 253-2	44
COD 154-1	36
COD 154-2	53

Código planta F₁	Nro. de semillas F₂ obtenidas
Cruzamientos RxS	
COD 154-3	31
COD 155-1	52
COD 155-2	53
COD 155-3	88
COD 156-1	76
COD 156-2	117
COD 157-1	53
COD 157-2*	83
COD 257-1	78
COD 258-1	99
COD 258-2*	122
COD 159-1	26
COD 159-2	83
COD 259-1	42
COD 160-1	88
COD 161-1	71
COD 161-2	57
COD 161-3	59
COD 162-1	36
COD 162-2	44
COD 162-3	45
COD 163-1	67
COD 163-2	78
COD 163-3	74
COD 164-1	48
COD 164-2	52
COD 165-1	108
COD 165-2	109
COD 165-3	108

Código planta F₁	Nro. de semillas F₂ obtenidas
Cruzamientos RxS	
COD 166-1	68
COD 166-2	46
COD 166-3	64
COD 167-1	99
COD 167-2	110
COD 168-1	40
COD 168-2	100
COD 168-3	94
COD 169-1	116
COD 169-2	128
COD 169-3	102
COD 170-2	47
COD 171-1	114
COD 171-2	104
COD 172-1*	105
COD 173-1	107
COD 173-2	128
COD 173-3	107
COD 174-1	80
COD 174-2	97
COD 175-1	110
COD 175-2	116
COD 175-3	89
COD 176-1	61
COD 176-2	81
COD 176-3	82
COD 177-1	83
COD 177-2	98
COD 177-3	70

Código planta F₁	Nro. de semillas F₂ obtenidas
Cruzamientos RxS	
COD 178-1	72
COD 178-2	65
COD 178-3	40
COD 179-1	125
COD 179-2	136
COD 179-3	110
COD 180-1	161
COD 180-2	51
COD 180-3	96
COD 181-1	117
COD 181-2	90
COD 182-1	80
COD 182-2	106
COD 184-1	16
COD 184-2	65
COD 185-1	87
COD 185-2	96
COD 185-3	86
COD 186-1	91
COD 186-2	119
COD 186-3	108
COD 187-1	108
COD 187-2	96
COD 187-3	105
COD 188-1	116
COD 188-2	126
COD 188-3	138
COD 189-1	104
COD 189-2	47

Código planta F₁	Nro. de semillas F₂ obtenidas
Cruzamientos RxS	
COD 189-3	77
COD 190-1	77
COD 190-2	83
COD 190-3	77
COD 191-1	118
COD 192-1	97
COD 192-2	135
COD 192-3	116
COD 193-1	74
COD 193-2	117
Cruzamientos RxR	
COD 194-1	60
COD 194-2	84
COD 194-3	81
COD 195-1	49
COD 195-2	83
COD 195-3	135
COD 196-1	36
COD 196-2	86
COD 196-3	80
COD 197-1	91
COD 197-2	153
COD 197-3	45
COD 198-1	110
COD 198-2	135
COD 198-3	54
COD 199-1	80
COD 200-1	76

Código planta F₁	Nro. de semillas F₂ obtenidas
Cruzamientos RxR	
COD 200-2	86
COD 201-1	24
COD 202-1	53
COD 202-2	26
COD 203-1	21
COD 203-2	14
COD 203-3	94
COD 204-1	56
COD 204-2	106
COD 204-3	72
COD 205-1	45
COD 205-2	177
COD 205-3	119
COD 206-1	43
COD 206-2	87
COD 206-3	56
COD 207-1	40
COD 207-2	51
COD 207-3	104
COD 208-1	113
COD 208-2	118
COD 208-3	92
COD 209-1	122
COD 209-2	105
COD 210-1	68
COD 211-1	73
COD 211-2	85
COD 211-3	48

IIC.2. Caracterización y análisis de atributos – marcadores morfológicos de los individuos F₂

La Tabla 13A detalla los caracteres morfológicos evaluados en los individuos F₂ y el resultado de la Prueba χ^2 realizada con el fin de analizar la segregación de algunos marcadores morfológicos y verificar si ajustan a la proporción fenotípica (3 fenotipo dominante : 1 fenotipo recesivo) esperada para un gen de herencia simple y mendeliana (Lacadena 1976; Cubero 2002).

Tabla 13A. Caracteres morfológicos observados en la generación de individuos F₂ (derivados de individuos F₁ heterocigotas validados molecularmente).

Código individuos F ₃	Caracteres morfológicos observados en F ₂			
	Forma folíolo	Color flor	Color pubescencia	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS				
COD 1-148-1/2	oblonga (47) lanceolada (18) ($\chi^2=0,251$; $P=0,62$)	blanca	marrón	opaco
COD 1-249-1	oblonga	púrpura (18) blanca (6) ($\chi^2=0$; $P=1$)	marrón	opaco
COD 1-155-1	oblonga	púrpura (27) blanca (12) ($\chi^2=0,692$; $P=0,41$)	marrón	opaco
COD 1-157-1/2	oblonga (60) lanceolada (31) ($\chi^2=3,989$; $P=0,05$)	blanca	marrón	opaco
COD 1-258-2	oblonga	púrpura (57) blanca (21) ($\chi^2=0,154$; $P=0,69$)	marrón	opaco
COD 1-160-1*	oblonga	púrpura (31) blanca (22) ($\chi^2=7,704$; $P=0,01$)*	marrón	opaco
COD 1-161-3	oblonga	blanca	marrón (15) gris (9) ($\chi^2=2$; $P=0,16$)	opaco
COD 1-162-1/2	oblonga	púrpura	marrón	brillante (36) opaco (6) ($\chi^2=2,571$; $P=0,11$)
COD 1-163-2	oblonga (59) lanceolada (25) ($\chi^2=1,016$; $P=0,31$)	púrpura	marrón	brillante (56) opaco (28) ($\chi^2=3,111$; $P=0,08$)

Código individuos F ₃	Caracteres morfológicos observados en F ₂			
	Forma folíolo	Color flor	Color pubescencia	Brillo tegumento
Cruzamientos RxS				
COD 1-165-1	oblonga	púrpura	marrón	brillante (65) opaco (27) ($\chi^2=0,928$; $P=0,34$)
COD 1-168-2	oblonga	púrpura	marrón	brillante (42) opaco (20) ($\chi^2=1,742$; $P=0,19$)
COD 1-169-3	oblonga (27) lanceolada (15) ($\chi^2=2,571$; $P=0,11$)	púrpura (35) blanca (7) ($\chi^2=1,556$; $P=0,21$)	marrón (25) gris (17) ($\chi^2=5,365$; $P=0,02$)	opaco
COD 1-170-2	lanceolada	blanca	marrón (16) gris (2) ($\chi^2=1,852$; $P=0,17$)	opaco
COD 1-171-1*	oblonga (27) lanceolada (9) ($\chi^2=0$; $P=1$)	púrpura (30) blanca (6) ($\chi^2=1,333$; $P=0,25$)	marrón (34) gris (2) ($\chi^2=7,259$; $P=0,01$)*	opaco
COD 1-172-1*	oblonga (42) lanceolada (24) ($\chi^2=4,545$; $P=0,03$)*	blanca	gris	opaco
COD 1-173-2	oblonga	púrpura	marrón (39) gris (21) ($\chi^2=3,2$; $P=0,07$)	opaco
COD 1-175-1	oblonga	púrpura	marrón (56) gris (25) ($\chi^2=1,486$; $P=0,22$)	opaco
COD 1-193-2*	oblonga (35) lanceolada (4) ($\chi^2=4,521$; $P=0,03$)*	púrpura (33) blanca (6) ($\chi^2=1,923$; $P=0,17$)	marrón (24) gris (15) ($\chi^2=3,769$; $P=0,05$)	opaco
Cruzamientos RxR				
COD 1-197-3	oblonga (12) lanceolada (9) ($\chi^2=3,571$; $P=0,06$)	blanca	marrón (14) gris (7) ($\chi^2=0,777$; $P=0,38$)	opaco
COD 1-205-2	oblonga	púrpura (39) blanca (21) ($\chi^2=3,2$; $P=0,07$)	marrón (40) gris (20) ($\chi^2=2,223$; $P=0,14$)	opaco
COD 1-206-2	oblonga (29) lanceolada (16) ($\chi^2=2,675$; $P=0,1$)	púrpura (33) blanca (12) ($\chi^2=0,067$; $P=0,8$)	marrón (28) gris (17) ($\chi^2=3,919$; $P=0,05$)	brillante (31) opaco (14) ($\chi^2=0,896$; $P=0,34$)

*Casos cuya proporción fenotípica no ajusta a la proporción esperada (3:1) para un carácter mayor y simple; $\chi^2= 3,841$.

Los resultados observados de segregación de los caracteres morfológicos en los individuos F_2 (segregación esperada 3:1 para aquellos alelos dominantes: recesivos, $\alpha= 0,05$), mostraron, en la mayoría de las evaluaciones, que estos caracteres siguieron las leyes de herencia mendeliana de segregación. Sin embargo, hubieron cuatro casos de desfase en los cruzamientos COD 1-160-1, 1-171-1, 1-172-1 y 1-193-2 (Tabla 13A, notación*) para el color de flor, color de pubescencia y forma del folíolo, respectivamente, que justificarían el uso de marcadores moleculares como técnica de selección temprana de individuos F_1 efectivamente heterocigotas híbridos, para evitar estas incongruencias en las poblaciones F_2 .

IIC.3. Obtención de semillas de la tercera generación filial (F_3) a partir de individuos F_2 descendientes de padres F_1 (heterocigotas) validados molecularmente por SNP

En Septiembre de 2016 se sembraron los plántulos de semillas F_2 y en marzo 2017 fueron oportunamente cosechados obteniendo vainas y semillas F_3 .

Sólo las semillas F_3 obtenidas de individuos F_2 originados a partir de semillas producidas por individuos F_1 validados estructural, morfológica y molecularmente por cebadores SNP, fueron sembradas y distribuidas en familias $F_{2:3}$.

La Tabla 13B muestra el número de familias $F_{2:3}$ (individuos F_3) sembradas y posteriormente evaluadas en Pruebas de Progenie durante 2017.

Tabla 13B. Individuos F_2 derivados de plantas F_1 heterocigotas validadas molecularmente y número de familias $F_{2:3}$ con mínimo de diez semillas F_3 producidas. En celeste se marcan las familias evaluadas en la Prueba de Progenie (Capítulo III).

Código individuos F_3	Nro. de Familias $F_{2:3}$
Cruzamientos RxS	
COD 1-148-1/2	65
COD 1-249-1	24
COD 1-155-1	39
COD 1-157-1/2	91
COD 1-258-2	78
COD 1-160-1	53

Código individuos F ₃	Nro. de Familias F _{2:3}
Cruzamientos RxS	
COD 1-161-3	24
COD 1-162-1/2	42
COD 1-163-2	84
COD 1-165-1	92
COD 1-168-2	62
COD 1-169-3	42
COD 1-170-2	18
COD 1-171-1	36
COD 1-172-1	66
COD 1-173-2	60
COD 1-175-1	81
COD 1-193-2	39
Cruzamientos RxR	
COD 1-197-3	21
COD 1-205-2	60
COD 1-206-2	45

Si bien los resultados observados de segregación de los caracteres morfológicos en los individuos F₂ (segregación esperada 3:1 para aquellos alelos dominantes: recesivos, $\alpha=0,05$), en la mayoría de las evaluaciones siguieron las leyes de herencia mendeliana de segregación, se registraron cuatro casos de variabilidad en la respuesta de los marcadores morfológicos utilizados (Tabla 13A).

Por ello, la utilización de los marcadores moleculares SNP en etapas iniciales de la selección y mejora genética permitió *obtener individuos F₁ cuya dotación heterocigota e híbrida fue validada molecularmente y aseguró avanzar de manera segura en las generaciones segregantes subsiguientes*, tal lo aplicado en Tabla 13B. Esta técnica biotecnológica constituyó una herramienta fundamental para la selección de las poblaciones F₂, F₃ y familias F_{2:3} provenientes de verdaderos híbridos F₁.

IIc. DISCUSIÓN PARCIAL

Respecto a la obtención de semillas F_2 , se logró cosechar la totalidad de las plantas F_1 *sembradas y caracterizadas como híbridos verdaderos por marcadores moleculares*. Esto es, 69 plantas F_1 provenientes de cruzamientos RxS y 9 plantas F_1 provenientes de cruzamientos RxR. De esta manera, se logró dar continuidad con el plan de generación de filiales necesarias para la formación de las familias $F_{2:3}$.

Al analizar los plántulos de semilla F_2 obtenida de plantas F_1 derivadas de cruzamientos RxS se observó que el 43,48% de las plantas F_1 ($n= 30$ plantas F_1) produjo 100 semillas o más, el 36,23% de las plantas F_1 ($n= 25$) produjo entre 70 y 99 semillas, mientras que el 20,29% de las plantas F_1 ($n= 14$) restantes produjeron menos de 69 semillas. Al analizar los plántulos de semillas F_2 obtenidas de plantas F_1 derivadas de cruzamientos RxR, el 55,56% de las plantas F_1 ($n= 5$) produjo 100 semillas o más, el 33,33% de las plantas F_1 ($n= 3$) produjo entre 70 y 99 semillas, mientras que el 11,11% de las plantas F_1 ($n= 1$) restantes produjeron menos de 69 semillas.

A partir de la siembra de las semillas y obtención de los individuos F_2 , el análisis de los caracteres morfológicos registrados en cada individuo mostró que la frecuencia fenotípica observada ajustó a la proporción 3:1 (3 rasgo dominante: 1 rasgo recesivo) en la mayoría de las observaciones y registros realizados (Tabla 13A). Sólo en cuatro casos puntuales el registro de marcadores morfológicos de poblaciones F_2 no ajustó a herencia mendeliana para un gen simple. Tal lo observado en la segregación del *color de flor* en el COD 1-160-1 ($\chi^2= 7,259$; $P= 0,01$), del *color de pubescencia* en el COD 1-171-1 ($\chi^2=7,259$; $P=0,01$) y de la forma del folíolo en los COD 1-172-1 y COD 1-193-2 ($\chi^2=4,545$; $P=0,03$ y $\chi^2=4,521$; $P=0,03$, respectivamente) (Tabla 13A). De acuerdo a lo reportado por Reyes Matamoros y Martínez Moreno (2001) esta variación en los resultados puede deberse, entre otros, a la posible inestabilidad del carácter en el fondo genético de los progenitores participantes en los cruzamientos, al menor número de individuos de tales poblaciones F_2 analizadas y/o a la plasticidad del material vegetal frente a ciertos factores de estrés manifestada durante el desarrollo en un espacio confinado. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Perry y McIntosh (1991), quienes observaron diferencias entre ciertos caracteres morfológicos, mientras reportaron que para su estudio, el número y forma de folíolos, el estrofiolo en el hilo,

la presencia de pubescencia y el color del cotiledón fueron aquellos caracteres que se expresaron relativamente estables y monomórficos.

Para otros autores, sin embargo, sus resultados mostraron variaciones en la expresión de los caracteres morfológicos citados en la Tabla 3, como resultante, entre otros factores, del efecto ambiental (Giancola, 1998; Echeverri et al., 1999). Se debe considerar además que estos caracteres pueden mostrar variaciones aún en un mismo genotipo (Giancola, 1998). Una de las causas de esta variación en la expresión fenotípica de tales atributos morfológicos podría deberse a que la mayoría de los genes que gobiernan los rasgos cualitativos en las plantas están regulados a nivel transcripcional (Verneti y Verneti Junior, 2017). Por lo tanto, la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales propone que las características más estables a ser utilizadas son el color de pubescencia, color de flor, color del hilo y grupo de madurez (Yang et al., 2010). Sin embargo, no siempre estos atributos resultan útiles para detectar polimorfismos o diferencias entre progenitores debido a que las variedades utilizadas como parentales fueron seleccionadas por ser divergentes y polimórficas al carácter de interés en estudio que fue R/S a la *CTS-Dpc*, y además poseen una gran relación genética, y por ende ocasionalmente tienen los mismos rasgos morfológicos. Por ello, se consideró primordial realizar la validación molecular de la dotación heterocigota e híbrida de los individuos F_1 en relación a sus progenitores, mediante marcadores moleculares SNP.

En cuanto a la producción de semillas F_3 para la formación de las familias $F_{2,3}$, en la mayoría de los casos se obtuvieron bajo número de semillas. Esto pudo deberse a la presencia del complejo de orugas defoliadoras (las más frecuentes en soja son *Rachiplusia nu*, *Colias lesbia*, *Loxostege bifidalis* y *Anticarsia gemmatalis*) y del complejo de chinches (chinche verde o *Nezara viridula*, chinche de la alfalfa o *Piezodorus guildinii*, chinche alquiche chico o *Edessa meditabunda*), debido a las condiciones ambientales favorables que se dieron para la reproducción de estos insectos. Considerando aquellas plantas provenientes de cruzamientos RxS, a partir de 18 combinaciones de cruzamientos (cruzamientos entre cada padre R con todos los padres S, para cada progenitor R propuesto), lo que consiste en el 52,94% de las combinaciones avaladas por marcadores moleculares, 5 (27,78%) de ellas produjeron más de 70 semillas, número de semillas mínimo recomendado necesarias para las Pruebas de Progenie. En el caso de las plantas provenientes de cruzamientos RxR, a partir de 3 combinaciones de cruzamientos (cruzamientos entre cada padre R con el resto de los padres

R, para cada progenitor R propuesto), lo que consiste en el 50% de las combinaciones positivas por marcadores moleculares, ninguna de ellas produjo más de 70 semillas (Tablas 12 y 13B).

Al considerar los requisitos protocolares implementados (fecundaciones efectivas evaluadas por controles morfológicos y estructurales-histológicos y validación molecular de la heterocigosis de individuos de la F₁) durante todo el avance generacional del proceso de mejora, la producción de semillas F₁ y F₂ obtenidas resultaron en número suficiente para continuar con el proceso de multiplicación hasta obtener vainas y semillas F₃, sólo para las interacciones provenientes de cruzamientos RxS.

La producción de semillas F₁, F₂ y F₃ para avanzar y obtener las respectivas familias F_{2:3} (Pruebas de Progenie) fue realizada considerando similares criterios técnicos (respecto a sustratos, manejo de luminosidad, aireación, temperatura y fisiología del cultivo), propuestos e implementados en estudios previos orientados a la búsqueda de genes de resistencia útiles y efectivos para otras enfermedades de soja. Entre ellas, se encuentran la cancrrosis del tallo de soja causada por *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Chiesa et al, 2009; 2013), podredumbre de la raíz causada por *Phytophthora sojae* (Sun et al., 2014), roya asiática de la soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Li et al., 2012b) y el mosaico de la soja producido por *Soybean mosaic virus* (Yu et al., 1993).

CAPÍTULO III

*Caracterización del tipo de herencia de los genes Rdc por genética clásica – convencional
basado en la asistencia de MM SNP en la filial F₁*

Actividades orientadas a cumplir el **Objetivo Específico 2 (OE.2a, OE.2b, OE.2c)**

ACTIVIDADES DESARROLLADAS PARA CUMPLIR EL OE.2a:

Evaluar e inferir la segregación genotípica del carácter resistencia a CTS causada por Dpc en la generación F₂ a través de la respuesta fenotípica de las familias F_{2:3} (Pruebas de progenie)

La selección basada en el fenotipo es un proceso lento y laborioso que requiere tiempo y recursos económicos. Además la utilización de este tipo de marcador de control del proceso de mejora puede ser riesgoso ya que puede estar condicionado a factores ambientales. En ese contexto, la biotecnología puede lograr que la aplicación de métodos convencionales de mejoramiento sea más eficaz ya que permite demostrar que las diferencias observadas entre los descendientes sean mayormente genéticas, y no debido a factores ambientales (Zohary, 1970; Vallejo Cabrera y Estrada Salazar, 2002; Peruzzo et al., 2017a; 2017b; 2018). Durante el proceso de mejoramiento clásico, la población segregante que confiere mayor información para dilucidar y definir el modo/tipo de herencia genética de un carácter es la filial F₂ y su caracterización fenotípica completa (Allard, 1956). Esta información se logra a través de las Pruebas de Progenie (F_{2:3}) que permiten inferir el genotipo de cada uno de los individuos F₂ de acuerdo a Lacadena (1976) y Cubero (2002). En este marco de análisis y durante el proyecto de tesis, se propuso la validación molecular temprana de los individuos F₁ para otorgar mayor certeza al este proceso de caracterización de las siguientes generaciones segregantes F₂ y F₃.

IIIa. MATERIALES Y MÉTODOS

IIIa.1. Evaluación de la respuesta fenotípica (R/S) de familias F_{2:3} derivadas de cada individuo F₂ al interactuar con una cepa seleccionada de Dpc

Para asegurar el manejo correcto de los planteles en el espacio disponible, en base a los criterios-controles morfológicos, estructurales (Tablas 2, 6 y 7), validación de F₁ por MM SNP (Tabla 10) y producción y disponibilidad de semillas (Tablas 12 y 13B), se realizó una selección estricta de dos poblaciones F₂. Sus semillas F₃ fueron sembradas conformando familias F_{2:3} con el fin de ser inoculadas y poder evaluar y estimar en forma completa la

reacción fenotípica de cada individuo F_3 frente a la cepa seleccionada *Dpc16*. Las generaciones F_2 , F_3 y familias $F_{2:3}$ evaluadas provienen de los cruzamientos entre los progenitores:

- Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible, COD 1-258-2
- Ge(13) resistente x Ge(12) susceptible, COD 1-157-1/2

El número de individuos F_3 inoculados en cada $F_{2:3}$ se escogió teniendo en cuenta la probabilidad del 95% de detectar un individuo homocigota recesivo (rr), disminuyendo al máximo el efecto ambiental, dentro de una misma familia $F_{2:3}$ (Allard, 1956; Chiesa et al., 2009; 2013; Peruzzo et al., 2017a; 2017b; 2018). Por ello, a partir de las semillas cosechadas de cada individuo F_2 , se sembraron las familias $F_{2:3}$ constituidas cada una de ellas por 10 individuos F_3 (Allard, 1956). Se colocó una semilla F_3 por vaso de 300 cc en una mezcla de sustrato 2:1 de tierra/vermiculita (Fig.11).

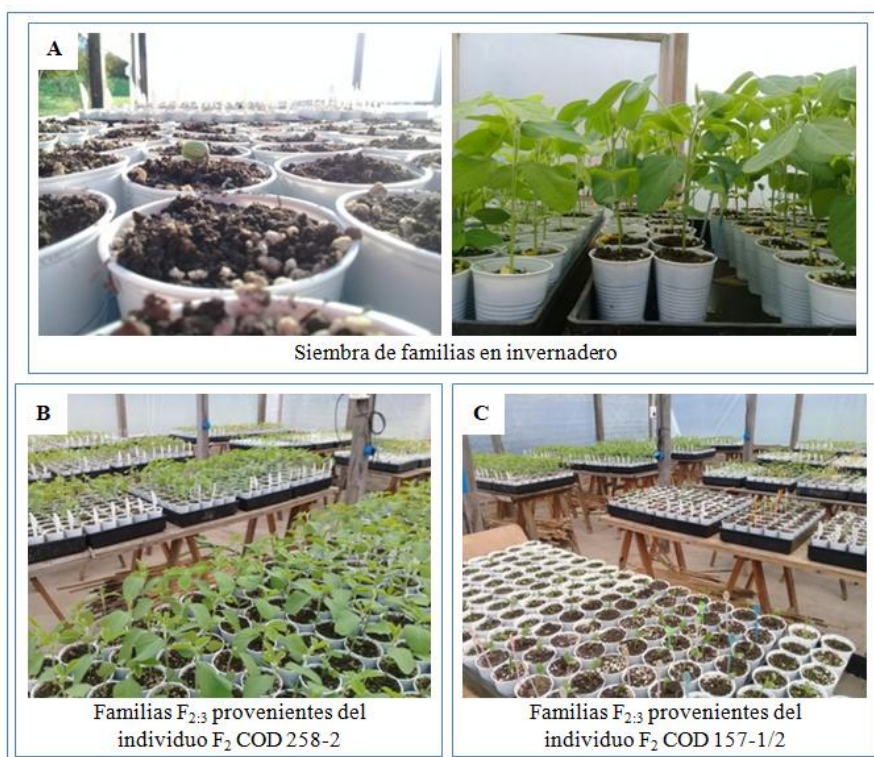


Figura 11. Ensayo de invernadero para realización de Pruebas de Progenie. **A.** Siembra de familias en invernadero; **B.** Familias $F_{2:3}$ provenientes del individuo F_2 COD 258-2; **C.** Familias $F_{2:3}$ provenientes del individuo F_2 COD 157-1/2. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2017.

Las plántulas se inocularon en el estadio V2-V3, equivalente a 1° y 2° hoja trifoliadas expandidas (Fehr y Caviness, 1977). En el hipocótilo, se realizó una incisión con una lámina de acero, en la que se insertó una pequeña sección de micelio (1x1mm), en lo posible exenta de medio de cultivo. Inmediatamente el punto-sitio de inoculación se cubrió con vaselina (Fig. 12).

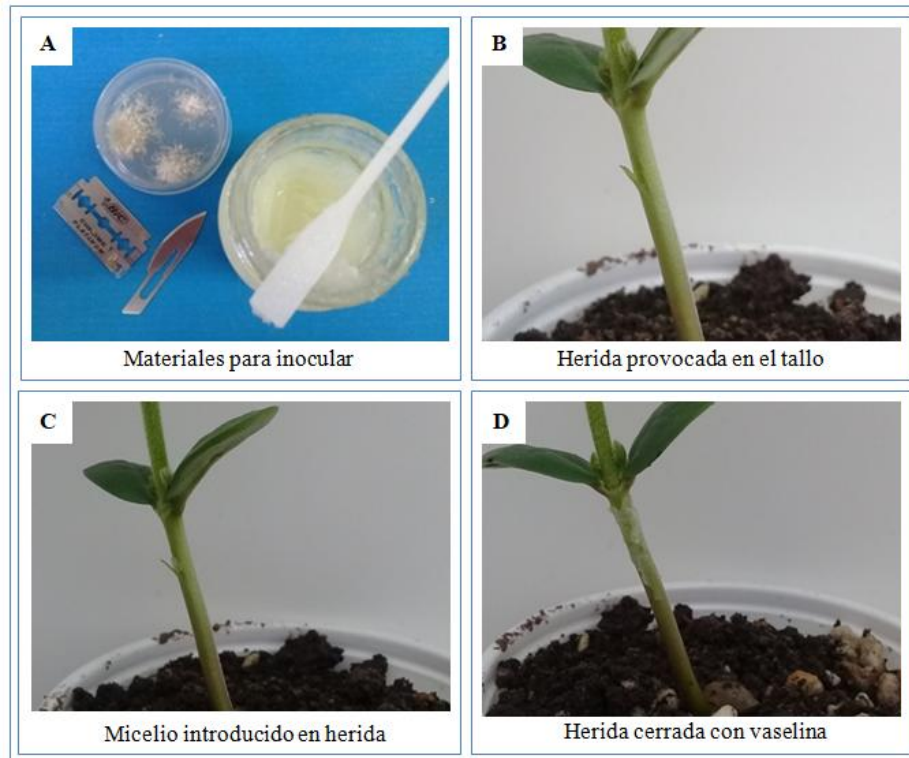






Figura 12. Elementos utilizados y procedimiento realizado para las inoculaciones de plantas de soja en estadio V2-V3.

Se inocularon además cada genotipo progenitor y cinco plantas F_1 con igual criterio que el descrito para las familias $F_{2,3}$ (Chiesa et al., 2009). Como control experimental, se incluyeron además dos tipos de plantas testigo: un control sin inocular y otro con herida sin micelio, a fin de validar que los síntomas fueron causados por la cepa *Dpc16* en estudio (Pioli et al., 2003). Durante las 72 horas posteriores a la inoculación, la totalidad de las plantas fue mantenida en alta humedad. Las inoculaciones se realizaron en invernadero con control de temperatura, a fin de otorgar las condiciones ambientales necesarias para que la interacción planta-patógeno sea efectiva (Keeling, 1988b; Pioli et al., 2003).

El grado de severidad de CTS en cada planta inoculada y los controles se evaluó utilizando una escala en base a los síntomas y expresión fenotípica de la enfermedad, que asigna un valor de severidad a cada planta (Tabla 14):

Tabla 14. Valores de sintomatología asignados a las plantas de soja inoculadas o testigos con un aislamiento de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* para las Pruebas de Progenie.

Sintomatología	Significancia	Imagen
0*	sin síntomas	
0,3*	cancro ó marchitez en etapas iniciales; o cancro como único síntoma resultante en etapas avanzadas del progreso de la enfermedad	
0,6	ambos síntomas, cancro y marchitez	

Sintomatología	Significancia	Imagen
1	planta muerta	

*Las plantas que preservaron niveles de severidad de 0 y 0,3 durante el transcurso del progreso de la CTS (56 dpi) se consideraron Plantas Vivas (PV) o Plantas Resistentes. Con igual criterio, las plantas que preservaron niveles de severidad de 0,6 y 1 durante el transcurso del progreso de la CTS (56 dpi) se consideraron Plantas enferma y/o Muerta (PM) o Plantas Susceptibles.

El grado de enfermedad se registró semanalmente, desde los 7 y hasta los 56 días post inoculación (dpi) a fin de caracterizar el progreso de la CTS-*Dpc* en la población de individuos F_3 totales o distribuidos en familias $F_{2,3}$. Se consideró como planta viva (PV) o resistente a aquel individuo que al final de 56 dpi presentó una sintomatología menor o igual a 0,3 de la escala sintomática. Por otro parte, aquel individuo que a los 56 dpi registró valores de sintomatología superior a 0,3 (mayor a 0,3) fue considerado planta muerta (PM) o susceptible (Chiesa et al., 2009; 2013) (Tabla 14).

El criterio utilizado en la Prueba de Progenie para evaluar la reacción de cada familia $F_{2,3}$ de 10 individuos F_3 a la CTS-*Dpc* e inferir el genotipo de su individuo (planta) progenitor F_2 , se presenta en la (Tabla 15):

Tabla 15. Criterio de inferencia de individuos F_2 basado en la Prueba de Progenie de las respectivas familias $F_{2,3}$ con mínimo de diez semillas F_3 producidas.

Nro. de Plantas Muertas (PM)/ Susceptibles (S) por familia	Inferencia de la generación F_2
0-1 PM/S	individuo F_2 homocigota (<i>Rdc1/Rdc1</i>)
2-5 PM/S	individuo F_2 heterocigota (<i>Rdc1/rdc1</i>)
6-10 PM/S	individuo F_2 homocigota (<i>rdc1/rdc1</i>)

Adecuándose los rangos al valor de PM/S observado a partir de los resultados del progenitor Resistente (Ge(13)) (Tabla 2). De esta manera el valor de severidad (n° de individuos o PM/S) utilizado como límite superior para inferir progenitores *Rdc1/Rdc1* en F₂ será definido por el valor de PM/S del progenitor Ge(13) (Chiesa et al.,2009).

IIIa. RESULTADOS

IIIa.1. Evaluación de la respuesta fenotípica (R/S) de familias F_{2:3} derivadas de cada individuo F₂ al interactuar con una cepa seleccionada de *Dpc*

IIIa.1.1. Filiales derivadas entre los progenitores Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible, COD 1-258-2

La evaluación de la reacción a la CTS causada por la cepa *Dpc16*, a los 56 dpi, mostró que:

- el cultivar Ge(4) (progenitor susceptible) tuvo una proporción de 2 PV/R: 8 PM/S
- el cultivar Ge(13) (progenitor resistente) tuvo una proporción de 9 PV/R: 1 PM/S

La respuesta fenotípica del progenitor Ge(13) a la CTS-*Dpc* causada en inoculaciones realizadas con esta misma cepa *Dpc16* en particular, ha sido validada en 5 repeticiones experimentales.

Los resultados de las caracterizaciones fenotípicas de las familias evaluadas provenientes de esta interacción se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16 Caracterización fenotípica de familias F_{2:3} provenientes del cruzamiento Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible expuestas al aislamiento *Dpc16* a los 56 días post inoculación (dpi).

Nro. de Plantas Muertas (PM)/ Susceptibles (S) por familia	Nro. de familia F _{2:3}
0-1 PM/S	Familias 2, 3, 5, 6, 9, 13, 17, 18, 23, 24, 27, 30, 32, 33, 44, 45, 51, 71, 72, 73, 74

Nro. de Plantas Muertas (PM)/ Susceptibles (S) por familia	Nro. de familia F _{2:3}
2-5 PM/S	Familias 1, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 26, 28, 29, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 47, 48, 49, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 65, 66, 68, 69, 70, 76, 77
6-10 PM/S	Familias 10, 25, 35, 53, 58, 62, 63, 64, 67, 75, 78

De esta manera, el ensayo de progenie de la población COD 1-258-2 dio como resultado observado en las Pruebas de Progenie: 21 familias F_{2:3} categorizadas como R; 42 familias F_{2:3} consideradas MR y/o MS; y 11 familias F_{2:3} categorizadas como S (Tablas 15 y 16) (Fig. 13).



Figura 13. Sintomatología observada en plantas de soja provenientes de las familias F_{2:3} COD 1-258-2. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias (33°01'LS y 60°53'LO), en el período 2017.

IIIa.1.2. Filiales derivadas entre los progenitores Ge(13) resistente x Ge(12) susceptible, COD 1-157-1/2

La evaluación de la reacción a la CTS causada por la cepa *Dpc16*, a los 56 dpi, mostró que el cultivar Ge(12) (progenitor susceptible) tuvo 7PM/S: 3PV/R, mientras que el cultivar Ge(13) (progenitor resistente) solo presentó 1PM/S: 9PV/R.

Los resultados de las caracterizaciones fenotípicas de las familias evaluadas provenientes de esta interacción se muestran en la Tabla 17:

Tabla 17. Caracterización fenotípica de familias $F_{2,3}$ provenientes del cruzamiento Ge(13) resistente x Ge(12) susceptible expuestas al aislamiento *Dpc16* a los 56 días post inoculación (dpi).

Nro. de Plantas Muertas (PM)/ Susceptibles (S) por familia	Nro. de familia $F_{2,3}$
0-1 PM/S	Familias 13, 18, 28, 83
2-5 PM/S	Familias 1, 2, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 25, 26, 31, 33, 34, 36, 37, 44, 49, 50, 55, 56, 58, 60, 62, 69, 71, 73, 74, 75, 77, 81, 82, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99
6-10 PM/S	Familias 3, 5, 19, 20, 24, 29, 32, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 53, 54, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 67, 68, 72, 78, 79, 80, 84, 87, 97, 98, 100

El ensayo de progenie de la población COD 1-157-1/2 dio como resultado observado en las Pruebas de Progenie: 4 familias $F_{2,3}$ categorizadas como R; 48 familias $F_{2,3}$ consideradas MR y/o MS; y 35 familias $F_{2,3}$ categorizadas como S (Tabla 17) (Fig. 14).



Figura 14. Sintomatología observada en plantas de soja provenientes de las familias $F_{2,3}$ COD 1-157-1/2. Ensayo realizado en la Fac. de Cs. Agrarias ($33^{\circ}01'LS$ y $60^{\circ}53'LO$), en el período 2017.

IIIa. DISCUSIÓN PARCIAL

La técnica de inoculación y la escala de evaluación de síntomas implementadas resultaron efectivas para la diferenciación de PV/R y PM/S en progenitores R/S, F_1 , F_2 , F_3 y $F_{2,3}$, pues ha sido desarrollada bajo protocolo en los últimos 20 años (Pioli et al., 1997; 2001; 2003; Chiesa et al., 2009; 2013; Peruzzo et al., 2008; 2010a; 2010b; 2017a; 2017b; 2017d; 2018). Estos resultados son comparables con lo expuesto por otros autores en el estudio de la cancrrosis del tallo de soja en estadios tempranos de desarrollo de las plantas bajo condiciones ambientales controladas (Keeling, 1982; Keeling, 1985; Black et al., 1996; Rupe et al., 1999; Bradley y Li, 2006; Thickett et al., 2007; Sun et al., 2012).

La finalidad de un ensayo de inoculaciones en estadios tempranos consiste en ser capaces de extrapolar la reacción de las plantas con la reacción del cultivar cuando está sujeto al ataque del patógeno bajo condiciones naturales a campo. La utilidad de las técnicas de inoculación artificial en un programa de mejoramiento depende de cuán bien la reacción de las plantas inoculadas artificialmente coincida con la respuesta de las plantas atacadas por el patógeno bajo condiciones de campo (Keeling, 1982). En el presente ensayo, los valores de severidad obtenidos permitieron analizar fehacientemente dos poblaciones segregantes, discriminando

entre líneas resistentes, moderadamente resistentes/susceptibles y susceptibles. El uso de esta técnica permite ahorrar tiempo, trabajo y espacio físico.

No se registraron síntomas de la enfermedad en los controles negativos (plantas heridas sin inocular). El patógeno fue re-aislado de las lesiones (síntomas) e identificado para dar cumplimiento a los postulados de Koch.

La validación molecular temprana de las F₁ como homocigotas o híbridos de sus progenitores por SNP, la metodología experimental de las respectivas poblaciones F₂ y F₃ derivadas de tales individuos (F₁ confirmados molecularmente) permitió realizar las Pruebas de Progenie de dos cruzamientos, COD 258 (Ge(13)xGe(4)) y COD 157 (Ge(13)xGe(12)) de manera efectiva ya que se logró la **caracterización fenotípica** que aportó la información necesaria para inferir la **caracterización genotípica** de sus progenitores o individuos F₂ (Tablas 16 y 17) y evaluar el ajuste de los valores teóricos esperados en contraposición con los observados.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS PARA CUMPLIR EL OE.2b y 2c:

2b. Definir el número y el tipo de herencia de/los gen/es *Rdc* a la CTS causada por *Dpc*.

2c. Determinar si el comportamiento de los genotipos resistentes seleccionados a partir de diferentes fondos genéticos como potenciales fuentes de resistencia está regulado por el/los mismo/s o diferente/s gen/es *Rdc* e identificar los genes involucrados.

IIIb. MATERIALES Y MÉTODOS

IIIb.1. Análisis de segregación de las familias $F_{2:3}$ o Pruebas de Progenie

A partir de la reacción fenotípica observada en las Pruebas de Progenie frente a la enfermedad CTS causada por *Dpc* (Tablas 16 y 17), se infirieron las frecuencias genotípicas de la respectiva generación precedente F_2 (Bowers et al., 1993; Tyler, 1996) (Tabla 18).

Tabla 18. Segregación fenotípica y genotípica esperada para un locus con dominancia completa en las distintas generaciones filiales (Lacadena, 1976).

Generación	Segregación fenotípica	Segregación genotípica
F_1	todos los individuos resistentes	Todos los individuos Rr
F_2	3 Resistentes : 1 Susceptible	1 RR : 2 Rr : 1 rr
F_3	5 Resistentes : 3 Susceptibles (*)	3 RR : 2 Rr : 3 rr
Prueba de Progenie $F_{2:3}$	Familias (**) 1 Resistente : 2 heterocigotas : 1 Susceptible	

En esta tesis se evaluó fenotípicamente el comportamiento de la generación F_1 , y la generación F_3 , tanto en forma individual (*) como agrupada por familias $F_{2:3}$ (**) (Prueba de Progenie). La generación F_2 no fue evaluada fenotípicamente frente a CTS-*Dpc*, sino que su proporción o frecuencia genotípica fue inferida a partir de la Prueba de Progenie.

En base a las Tablas 15, 16, 17 y 18 se puede interpretar que las proporciones fenotípicas de las familias F_{2:3} evaluadas como resistentes derivan de individuos F₂ homocigotas dominantes (*Rdc/Rdc*), las familias consideradas intermedias entre resistencia/susceptibilidad provienen de individuos F₂ heterocigotas (*Rdc/rdc*) y las familias evaluadas susceptibles provienen de individuos F₂ homocigotas recesivos (*rdc/rdc*).

El análisis de segregación de los genes *Rdc* en cada generación estudiada se llevó a cabo realizando la prueba estadística no paramétrica de Chi-Cuadrado (χ^2), que permitió verificar la bondad de ajuste de las observaciones fenotípicas en familias F₃ a una segregación genotípica 1:2:1 en la generación F₂ (Lacadena, 1976; Pierce, 2010).

La prueba χ^2 también se aplicó para verificar la segregación individual en la generación F₃, sin agrupar en familias; cuyo valor χ^2 esperado es una segregación fenotípica de 5 resistentes: 3 susceptibles (Tabla 18).

IIIb.2. Análisis de independencia entre genes asociados a caracteres morfológicos y a la resistencia a CTS-*Dpc*

Considerando que se conoce el tipo de *herencia* y *localización teórica* del *carácter color de flor* (*WI* púrpura dominante, *wI* blanca recesiva, en el cromosoma 13 del germoplasma de soja), durante el presente estudio se evaluó la segregación y el tipo de herencia del gen que regula el *color de flor* en la población de individuos F₂ derivados del mismo cruzamiento COD 1-258-2 (Ge(13) x G(4)), y la reacción fenotípica a CTS-*Dpc* (*Rdc1* resistencia o *rdc1* susceptibilidad) sobre individuos de la filial F₃ y las familias F_{2:3} (constituidas por 10 plantas originadas a partir de un mismo individuo F₂) (Pruebas de Progenie). De esta manera se buscó poder inferir a través de cada familia F_{2:3} el genotipo de su individuo antecesor en F₂ para dicho carácter.

De esta manera, se analizó si tales caracteres (*resistencia a CTS-Dpc* y *color de flor*) podrían estar ligados en el mismo cromosoma o si ellos podrían estar regulados por genes independientes de segregación mendeliana (frecuencia fenotípica 9:3:3:1).

IIIb. RESULTADOS

IIIb. Caracterización fenotípica de poblaciones segregantes frente a CTS-Dpc. Análisis de segregación de las familias F_{2:3} o Pruebas de Progenie

IIIb.1. Familias F_{2:3} provenientes del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), COD 1-258-2

El análisis de estos resultados (datos observados) mediante la Prueba de χ^2 mostró que el valor de χ^2 calculado fue 4,054 y menor al valor de χ^2 tabulado de 5,991 para 2 grados de libertad y un $\alpha= 0,05$ (Tabla 19). De esta manera, el valor de χ^2 calculado quedó en la zona de *no* rechazo de (H₀) y por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula que supone, en este caso, que existe al menos un locus de resistencia en el germoplasma vegetal evaluado.

Tabla 19. Análisis de progenie F_{2:3} mediante cálculo de Chi-cuadrado para inferir las frecuencias genotípicas de los individuos F₂ de la población COD 1-258-2 (Ge(13) x Ge(4)).

Genotipo F ₂	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
RR	21	18,5	2,5	6,25	0,3378
Rr	42	37	5	25	0,6757
rr	11	18,5	-7,5	56,25	3,0405
	74	74	0		$\chi^2_{\text{obs}} = 4,054$

Cuando se analizó la segregación fenotípica de la generación F₃ completa de esta misma población se observaron 466 PV (resistentes) y 274 PM (susceptibles), proporción que ajustó a la segregación fenotípica 5 PV/R : 3 PM/S esperada para un gen con dominancia completa en generación F₃ (Tabla 20).

El análisis de los resultados (datos observados) mediante la Prueba de χ^2 mostró que el valor de χ^2 calculado= 0,071 fue menor al valor de χ^2 tabulado de 3,841 para 1 grado de libertad y un $\alpha= 0,05$; estando el valor de χ^2 calculado en la zona de *no* rechazo de H₀, y por lo tanto se aceptó la hipótesis nula que proponía que esta proporción en F₃ corresponde y refiere a un locus con dominancia completa (H₀) (Tabla 20) (Lacadena, 1976).

Tabla 20. Análisis de la segregación y frecuencia fenotípica del carácter Resistencia a CTS-*Dpc* en la generación F₃ completa de la población COD 1-258-2, mediante cálculo de Chi-cuadrado.

Fenotipo F ₃	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
PV	466	462,5	3,5	12,25	0,0265
PM	274	277,5	-3,5	12,25	0,0441
	740	740	0		$\chi^2_{\text{obs}} = \mathbf{0,071}$

Los resultados fenotípicos obtenidos sobre la reacción frente a CTS-*Dpc* del conjunto de genotipos y poblaciones segregantes, todos provenientes del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), esto es: progenitores, individuos F₁, la población completa F₃ y las familias F_{2:3} (Pruebas de Progenie), que permitieron inferir el genotipo de los respectivos individuos F₂, junto con el registro y análisis de severidad a CTS-*Dpc* observados en las plantas en una población F₂, confirmaron la hipótesis planteada (H₀ que al menos existe un locus de resistencia *Rdc* en el germoplasma vegetal evaluado) (Tabla 21).

Además de caracterizar fenotípicamente frente a CTS-*Dpc* a los individuos F₃ totales (proporción fenotípica 5:3) y distribuidos en las familias F_{2:3} (Pruebas de Progenie) (proporción fenotípica 1:2:1) e inferir las proporciones genotípicas (*1Rdc/Rdc* : *2Rdc/rdc* : *1rdc/rdc*) de los respectivos progenitores en F₂, se realizó la caracterización fenotípica por inoculación de otra población F₂ derivada del mismo cruzamiento COD 258 (Ge(13)xGe(4)) frente a CTS-*Dpc* (Tabla 21), confirmando la frecuencia fenotípica *3Rdc/___* : *1rdc/rdc*

Tabla 21. Reacción fenotípica y caracterización genotípica de los progenitores Ge(13) resistente y Ge(4) susceptible, de las familias F_{2:3}, de las progenies F₃ de la población segregante COD 1-258-2 y de una población F₂ derivada del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), en la interacción específica con el aislamiento *Dpc* 16. La reacción de la enfermedad fue cuantificada a los 56 días post inoculación.

Líneas progenitoras y progenies	Nro. de plantas o familias inoculadas	Hipótesis	Razón esperada	Reacción de enfermedad (nro. de plantas o familias observadas) ^f			$\chi^2 L^g$	P ⁱ
				R	Seg	S		
Ge(13)	10 ^a	R	--	9	1	--	--	
Ge(4)	10 ^a	S	--	2	8	--	--	

Líneas progenitoras y progenies	Nro. de plantas o familias inoculadas	Hipótesis	Razón esperada	Reacción de enfermedad (nro. de plantas o familias observadas) ^f			$\chi^2 L^g$	P ⁱ
				R	Seg	S		
F ₂ (COD 258-2)	32 ^a	3:1 ^c	24:8	26		6	0,67 ns ^h	0,41
F _{2:3} (COD 1-258-2)	74 ^b	1:2:1 ^d	18,5: 37: 18,5	21	42	11	4,05 ns ^h	0,13
F ₃	740 ^a	5:3 ^e	462,5: 277,5	466		274	0,07 ns ^h	0,79

^a Número de plantas.

^b Número de familias. Se inocularon 10 plantas por cada familia F_{2:3}.

^c Proporción fenotípica en generación F₂.

^d Proporción genotípica en generación F₂.

^e Proporción fenotípica en generación F₃.

^f R = resistente, Seg = segregante, S = susceptible.

^g Chi cuadrado de la segregación geno-fenotípica.

^h ns: no existe diferencia significativa entre los valores observados y los esperados ($P \leq 0,05$).

ⁱ Probabilidad de un valor mayor de $\chi^2 L$.

IIIb.2. Análisis de independencia entre genes asociados a caracteres morfológicos y a la resistencia a CTS-*Dpc*

La población COD 1-258-2 proviene del cruzamiento de los progenitores Ge(13) y Ge(4). La Tabla 2 muestra que sólo dos caracteres regulados por genes mayores y de herencia mendeliana podrían diferenciar a ambos progenitores, el *Rdc/rdc* (resistencia a CTS-*Dpc*) y *Wl/wl* (color de flor). El genotipo Ge(13) es Resistente a CTS-*Dpc* (*Rdc1*) y tiene flores blancas (*wl*), mientras que Ge(4) es susceptible a CTS-*Dpc* (*rdc1*) y tiene flores violetas (*Wl*).

El análisis χ^2 de la población de 74 individuos F₂ para ambos caracteres, ya sea por el registro directo del *color de flor* (*Wl/wl*) en cada individuo F₂ y el valor de *reacción a CTS por Dpc* (*Rdc1/rdc1*) inferido y asignado a cada uno de estos 74 individuos F₂ a través de la Prueba de Progenie (F_{2:3}), permitió analizar si ambos genes segregan de manera independiente y con una proporción fenotípica 9:3:3:1 (Lacadena, 1976; Cubero, 2002).

Para el caso en estudio, el análisis de los resultados obtuvo un valor de χ^2 calculado de 4,270; $p = 0,23$ (Tabla 22), que fue menor al valor de χ^2 tabulado de 7,815 para 3 grados de libertad, con un $\alpha = 0,05$. Por ello, se aceptó la hipótesis nula (H₀) y se verificó que los genes *Wl/wl* y *Rdc1/rdc1* son independientes (no ligados).

Tabla 22. Análisis de progenie F_{2:3} mediante cálculo de Chi-cuadrado para inferir la segregación de los caracteres *resistencia a CTS-Dpc* y *color de flor* en la población COD 1-258-2 (Ge(13) x Ge(4)).

Fenotipo F ₂	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
<i>Rdc1 Wl</i>	48	41,6	6,375	40,641	0,9764
<i>Rdc1 wl</i>	15	13,9	1,125	1,266	0,0912
<i>rdc1 Wl</i>	9	13,9	-4,875	23,766	1,7128
<i>rdc1 wl</i>	2	4,6	-2,625	6,891	1,4899
	74	74	0		$\chi^2_{obs} = 4,270$

El análisis de independencia permitió inferir que el *carácter resistencia a CTS-Dpc* y el *carácter color de flor* están regulados por genes independientes, lo que significa que *no* están ubicados sobre el mismo cromosoma 13 del germoplasma de soja, o bien ambos genes están ubicados en el cromosoma 13 pero a una distancia mayor a 50 cM (Tabla 23).

Tabla 23. Proporción fenotípica en generación F₂ esperada para dos genes independientes y dominancia completa.

Progenie	Nro. de plantas evaluadas	Hipótesis	Razón esperada	Fenotipo ^b				χ^2 L ^c	P ^e
				RW1	Rw1	rW1	rw1		
F ₂	74	9:3:3:1 ^a	41,6:13,9:13,9;4;6	48	15	9	2	4,27 ns ^d	0,23

^aProporción fenotípica en generación F₂.

^bRW1= planta resistente con flor violeta, Rw1= planta resistente con flor blanca, rW1= planta susceptible con flor violeta, rw1= planta susceptible con flor blanca.

^cChi cuadrado de la segregación fenotípica.

^dns: no existe diferencia significativa entre los valores observados y los esperados (P ≤ 0,05).

^eProbabilidad de un valor mayor de χ^2 L.

IIIb.3. Familias F_{2:3} provenientes del cruzamiento Ge(13) x Ge(12), COD 1-157-1/2

El análisis de estos resultados (datos observados) mediante Prueba de χ^2 mostró que el valor de χ^2 calculado de 23,023 fue mayor al valor de χ^2 tabulado de 5,991 para 2 grados de libertad y un $\alpha = 0,05$ (Tabla 24). De esta manera, el valor de χ^2 calculado quedó en la zona de

rechazo de H_0 . Por lo tanto, la hipótesis nula basada en el supuesto de estar en presencia de un locus con dominancia completa (Tabla 18), fue rechazada (Lacadena, 1976; Cubero, 2002).

Tabla 24. Análisis de progenie $F_{2,3}$ mediante cálculo de Chi-cuadrado para inferir las frecuencias genotípicas de los individuos F_2 de la población COD 1-157-1/2 (Ge(13) x Ge(12)).

Genotipo F_2	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
RR	4	21,75	-17,75	315,06	14,4856
Rr	48	43,5	4,5	20,25	0,4655
rr	35	21,75	13,25	175,56	8,0718
	87	87	0		$\chi^2_{\text{obs}} = \mathbf{23,023}$

Como χ^2 observado > χ^2 esperado (5,991), se rechaza la H_0 que al menos existe un locus de resistencia en el germoplasma vegetal evaluado

Cuando se analizó la segregación fenotípica de la generación F_3 completa de esta misma población se observaron 439 PV (resistentes) y 431 PM (susceptibles), proporción que no ajustó a la razón de segregación fenotípica esperada 5 PV : 3 PM para un gen con dominancia completa en la generación F_3 (Tablas 18 y 25). El análisis de los resultados (datos observados) mediante Prueba de χ^2 mostró que el valor de χ^2 calculado= 53,812 fue mayor al valor de χ^2 tabulado de 3,841 para 1 grado de libertad y un $\alpha= 0,05$; de esta manera el valor de χ^2 calculado se ubicó en la zona de rechazo de la hipótesis nula (H_0) (Tabla 25) (Lacadena, 1976; Cubero, 2002).

Tabla 25. Análisis de la segregación y frecuencia fenotípica del carácter Resistencia a CTS-*Dpc* en la generación F_3 completa de la población COD 1-157-1/2, mediante cálculo de Chi-cuadrado.

Fenotipo F_3	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
PV	439	543,75	-104,75	10972,56	20,1794
PM	431	326,25	104,75	10972,56	33,6324
	870	870	0		$\chi^2_{\text{obs}} = \mathbf{53,812}$

Como χ^2 observado > χ^2 esperado/tabulado (3,841), se rechaza la H_0 que al menos existe un locus de resistencia en el germoplasma vegetal evaluado

En conclusión, para esta interacción (COD 1-157-1 y COD 1-157-2), la expresión fenotípica frente a CTS-*Dpc* observada en los progenitores, F_1 y las correspondientes familias $F_{2,3}$ (que

permiten inferir las frecuencias genotípicas de los individuos F₂), no ajustaron a las frecuencias esperadas para un gen de herencia mendeliana simple (Tablas 18, 24, 25 y 26). La segregación de la resistencia observada en las filiales tempranas (F₂ y F₃) derivadas de este cruzamiento resultó diferente a la observada en el cruzamiento Ge(13)xGe(4).

Tabla 26. Reacción fenotípica y caracterización genotípica de los progenitores Ge(13) resistente y Ge(12) susceptible, de las familias F_{2,3} y de las progenies F₃ de la población segregante COD 1-157-1/2, derivada del cruzamiento Ge(13) x Ge(12), en la interacción específica con el aislamiento *Dpc* 16. La reacción de la enfermedad fue cuantificada a los 56 días post inoculación.

Líneas progenitoras y progenies	Nro. de plantas o familias inoculadas	Hipótesis	Razón esperada	Reacción de enfermedad (nro. de plantas o familias observadas) ^e			$\chi^2 L^f$	P ^h
				R	Seg	S		
Ge(13)	10 ^a	R	--	9	1	--	--	
Ge(12)	10 ^a	S	--	3	7	--	--	
F _{2,3} (COD 1-157-1/2)	87 ^b	1:2:1 ^c	21,75: 43,5: 21,75	4	48	35	23,02 ns ^g	<0,001
F ₃	870 ^a	5:3 ^d	543,75: 326,25	439	431	53,81 ns ^g	<0,001	

^a Número de plantas.

^b Número de familias. Se inocularon 10 plantas por cada familia F_{2,3}.

^c Proporción genotípica en generación F₂.

^d Proporción fenotípica en generación F₃.

^e R = resistente, Seg = segregante, S = susceptible.

^f Chi cuadrado de la segregación geno-fenotípica.

^g ns: no existe diferencia significativa entre los valores observados y los esperados (P ≤ 0,05).

^h Probabilidad de un valor mayor de $\chi^2 L$.

Sin embargo, se analiza a continuación qué podría suceder si se tomara como alternativa de análisis un criterio menos estricto para evaluar la Prueba de Progenie en cada familia F_{2,3}, de 10 individuos F₃, e inferir luego el genotipo de su individuo (planta) progenitor F₂, de acuerdo a la propuesta de la Tabla 27:

Tabla 27. Nuevos criterios de inferencia de individuos F₂ basados en la Prueba de Progenie de las respectivas familias F_{2:3} COD 1-157-1/2.

Nro. de Plantas Muertas (PM)/ Susceptibles (S) por familia	Inferencia de la generación F ₂
0-2 PM/S	individuo F ₂ homocigota (<i>Rdc1/Rdc1</i>)
3-6 PM/S	individuo F ₂ heterocigota (<i>Rdc1/rdc1</i>)
7-10 PM/S	individuo F ₂ homocigota (<i>rdc1/rdc1</i>)

La Tabla 28 muestra un valor de χ^2 observado (3,713) menor al χ^2 esperado (5,991), por lo tanto se acepta la H₀, lo que significa que el cruzamiento COD-1-157 (Ge(13) x Ge(12)), en estas condiciones de análisis, confirma que el genotipo Ge(13) es portador de al menos un locus de Resistencia *Rdc1* detectado a través de las Pruebas de progenie F_{2:3} de los respectivos individuos de la población F₂ derivada de Ge(13)xGe(12).

Tabla 28. Nuevo análisis de progenie F_{2:3} mediante cálculo de Chi-cuadrado para inferir las frecuencias genotípicas de los individuos F₂ de la población COD 1-157-1/2 (Ge(13) x Ge(12)).

Genotipo F ₂	Observado	Esperado	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
RR	14	21,75	-7,75	60,06	2,7615
Rr	48	43,5	4,5	20,25	0,4655
rr	25	21,75	3,25	10,56	0,4856
	87	87	0		$\chi^2_{\text{obs}} = 3,713$

Como χ^2 observado (3,713) < χ^2 esperado (5,991), No se rechaza la H₀ y significa que al menos existe un locus de resistencia en el germoplasma vegetal evaluado

Este resultado confirmaría la existencia de al menos un gen de resistencia *Rdc1* en el germoplasma de soja evaluado, esto es en el progenitor Ge(13), sólo que el nivel de expresión fenotípica del gen *Rdc1* de resistencia a CTS-*Dpc* es diferente al combinarse Ge(13) con el progenitor susceptible Ge(12) (Pierce, 2010) respecto de la expresión de *Rdc1* al combinarse Ge(13)xGe(4).

IIIb. DISCUSIÓN PARCIAL

A partir de los resultados obtenidos, se propone la existencia de al menos un gen mayor simple de herencia mendeliana proveniente del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), lo que constituye el primer reporte mundial hasta el contenido relevado.

Las poblaciones utilizadas en este trabajo provenientes de los cruzamientos Ge(13) x Ge(4) (COD 1-258-2) y Ge(13) x Ge(12) (COD 1-157-1/2) permitieron realizar un análisis integrado de la segregación de un gen de resistencia a la CTS causada por *Dpc*. Las familias F_{2:3} provenientes del cruzamiento entre Ge(13) resistente y Ge(4) susceptible segregaron en una proporción 1:2:1 al interactuar con la cepa *Dpc*16. Al analizar la población F₃, la frecuencia observada de plantas vivas/muertas coincidió con lo esperado, una frecuencia 5:3. Para el caso de la población F₂ evaluada, la frecuencia fenotípica se ajustó a una descendencia 3:1. Por ello, el análisis de las poblaciones (una para la que se infirió el fenotipo F₂ a partir de familias F_{2:3} y otra con fenotipos medidos directamente) indicó que la resistencia a *Diaporthe phseolorum* var. *caulivora* en el germoplasma Ge(13) medida en este estudio está controlada por un único gen dominante de herencia mendeliana. Los análisis de ligamiento del gen *Rdc1* de resistencia a CTS-*Dpc* al carácter morfológico color de flor de la población F₂ indicaron que ambos locus segregan de manera independiente, es decir, se encuentran a más de 50 cM de distancia en el cromosoma 13 o en diferentes cromosomas. Por lo tanto, se concluye que la resistencia a *Diaporthe phseolorum* var. *caulivora* en el germoplasma Ge(13) está condicionada por un gen no notificado anteriormente. Proponemos que el nuevo locus se designe como *Rdc1*.

Por otro lado, las poblaciones evaluadas con la misma cepa de *Dpc* para el cruzamiento entre el mismo padre Resistente, Ge(13), con otro padre susceptible, Ge(12), no segregaron de la misma manera esperada para el caso anterior. Dado que en la primera interacción evaluada las frecuencias fenotípicas se ajustaron a un gen de resistencia dominante de herencia mendeliana, se descarta la hipótesis de un gen de resistencia recesivo en el germoplasma de soja Ge(13). Considerando que se ha utilizado la misma cepa en la totalidad de las inoculaciones y Pruebas de Progenie, una explicación alternativa para la segregación fenotípica diferente del gen *Rdc1* portado por el germoplasma Ge(13), puede basarse en la penetrancia genética incompleta del gen al combinarse e interactuar con el fondo genético del progenitor susceptible Ge(12) respecto del genotipo Ge(4). Se dice que la penetración de un

gen de resistencia es reducida o incompleta cuando algunos individuos no expresan el rasgo, a pesar de que portan el alelo de resistencia (Pierce, 2010). El fondo susceptible en el que se segregaba el gen *Rdc1* influyó en el grado de penetrancia en esta interacción particular (población COD 1-157-1/2).

Según Pierce (2010), la penetrancia depende de la cepa patógena, el fondo genético, las condiciones ambientales y las variaciones alélicas del gen de resistencia. En nuestro caso, la cepa del patógeno y las diferencias ambientales no constituyen una posible causa, debido a que ambas poblaciones, COD 1-258-2 y COD 1-157-1/2, fueron evaluadas en el mismo invernadero y al mismo tiempo. En trabajos anteriores se ha informado la presencia de penetrancia incompleta de genes de resistencia, como el caso de Melon Yellow Virus (Nuez et al., 1999), Beet Necrotic Yellow Vein Virus (Gidner et al., 2005), Sugarcane Mosaic Virus (Ingvarlsen et al., 2010), *Puccinia psidii* (Junghans et al., 2003), *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Chiesa et al., 2009).

Por su parte la expresividad se refiere a la variación en la expresión de un alelo cuando éste es penetrante, es decir, cuando el nivel de expresión del fenotipo resistente es variable entre individuos que portan el mismo gen de R (Pierce, 2010; Chiesa et al., 2013). En este caso, la proporción de individuos fenotípicamente Resistentes resultantes de las Pruebas de Progenie y sus ponderados F₂ en el Ge(13)xGe(12) es menor a la esperada, aun tratándose del mismo gen *Rdc1*. Habiéndose inoculado en todos los casos con la misma cepa *Dpc16*, la diferencia en expresividad sería producto de la combinación/interacción de los fondos genéticos en los que se expresa la resistencia. La expresión de un gen depende íntimamente de la relación de éste con el resto del genoma, y también de la relación genoma-ambiente (no considerado para el presente caso).

El descubrimiento y la introgresión de genes de resistencia a enfermedades es un hecho que provee beneficios en la ganancia de rendimiento y estabilidad del cultivo (Hartman et al., 2015b). En consecuencia, el proceso de detección de las fuentes de resistencia a *Dpc* en el germoplasma de soja hasta ahora no caracterizado para resistencia a esta enfermedad, la selección de los progenitores, la validación molecular temprana de las F₁ como heterocigotas e híbridos y la detección del gen de resistencia *Rdc1* a CTS causada por *Dpc*, constituye un hallazgo trascendental.

Si bien algunos autores basados en que la patogénesis y los mecanismos de defensa de la planta a *Dpc* son complejos, sugirieron que la resistencia a *Dpc* podría estar gobernada de

manera poligénica, dependiendo de la etapa de desarrollo del cultivo, y no de un solo gen en particular (Sun et al. 2012); en el presente estudio *Rdc1* se caracterizó como un gen mayor de herencia simple mendeliana (Peruzzo et al., 2017b; 2018). Además, las familias F_{2:3} seleccionadas como resistentes para la interacción Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible (COD 1-258-2) pueden ser útiles en el mejoramiento de la soja proporcionando la posibilidad de obtención de un cultivar con el carácter resistencia.

Ambos casos analizados para Resistencia a CTS-*Dpc* (Ge(13)-R x Ge(4) y Ge(13)-R x Ge(12)) resultaron ser un caso de análisis similar al observado en la expresión del gen *Rdm4* para la CTS-*Dpm*, cuando el mismo genotipo usado como fuente de resistencia (cultivar York, entre otros ancestros resistentes, DP415, DP3589 y Essex) (Tyler, 1996) fue cruzado con dos genotipos (susceptibles) diferentes que derivaron en los cultivares Hutcheson y Dowling, respectivamente. De acuerdo a lo informado por este autor, el resultado del cruzamiento entre el cultivar resistente Hutcheson y Dowling fue una proporción de 88PV/R: 0PM/S en la población F₂, indicando que al no haber PM/S, el gen *Rdm4* portado por Hutcheson es alélico del *Rdm4* aportado por Dowling (Tyler, 1996). Sin embargo, en otras interacciones planta-patógeno inoculadas con las mismas cepas causales de CTS-*Dpm*, estos cultivares Hutcheson y Dowling mostraron diferente nivel de severidad y diferente comportamiento frente a CTS-*Dpm*, debido, entre otros factores, a la expresión diferencial del gen *Rdm4* en ambos fondos genéticos (Pioli et al., 2003).

Para nuestro análisis el progenitor Ge(13)-R, portador del gen *Rdc1* para CTS-*Dpc*, presenta una instancia similar al caso del cultivar York-R / Essex que fue la fuente portadora del *Rdm4* para CTS-*Dpm* (Tyler, 1996). Y de la misma manera que aquel progenitor usado como fuente de resistencia a CTS-*Dpm*, este progenitor resistente Ge(13) fue cruzado con dos genotipos susceptibles diferentes Ge(4) y Ge(12). Este contexto de análisis permite suponer que el plantel de semillas F₅ derivada de las poblaciones segregantes del COD 258 (Ge(13)-R x Ge(4)) puede ser inoculada y seleccionada en nuevas pruebas de patogenicidad con *Dpc16* y/u otras cepas de *Dpc* y lograr así un cultivar mejorado y estabilizado similar al obtenido para resistencia a CTS-*Dpm*.

Para lograr este objetivo de aplicación directa al mejoramiento es necesario seleccionar en cada generación F₅ - F₇ a favor de las PV-R sobrevivientes luego de estar expuestas al patógeno *Dpc* causal de CTS por inoculación forzada. De esta manera se logrará estabilizar al genotipo Ge(13)-R para el locus de resistencia a CTS causada por *Dpc* y disminuir la

proporción actual de loci heterocigotas residuales observada a través de la caracterización molecular por SNP (Tablas 9A y 9B).

La obtención del gen *Rdc1* a *CTS-Dpc* e incorporación de este nuevo gen de resistencia en cultivares mejorados de soja puede tener amplios beneficios, ya que hasta el momento no existe resistencia conocida en los cultivares comerciales.

Las conclusiones de este estudio se reforzarán realizando una caracterización de las poblaciones F₂ utilizando marcadores de ADN.

CAPÍTULO IV

Discusión Integradora

La soja es un cultivo de gran importancia estratégica para Argentina y en particular para la Provincia de Santa Fe, no solo por la economía ligada a la producción y exportación de granos, sino también por el agregado de valor que implica el desarrollo de la industria aceitera y pecuaria.

Entre los principales factores que limitan la productividad, afectan la calidad de la semilla y aumentan los costos de producción, las enfermedades son las más importantes y difíciles de resolver (Yorinori et al., 2013). Una enfermedad en una planta resulta de la interacción compatible que ocurre como resultado de que un patógeno puede superar los mecanismos de resistencia de la planta hospedante (Fried et al., 2017).

Si bien las aplicaciones adecuadas de fungicidas pueden controlar las enfermedades de manera efectiva, estos insumos aumentan los costos de producción y suelen ser considerados como una propuesta no asociada al actual enfoque ecológico. Ya que los tratamientos con fungicidas pueden derivar en consecuencias imprevistas como la eliminación de hongos beneficiosos, los cuales compiten por el nicho ecológicos con los agentes patógenos (Ragsdale et al., 2008). Por otro lado, la rotación de cultivos surge como una acción recomendada para reducir las enfermedades (Curl, 1963). Sin embargo, la efectividad de la rotación generalmente depende de cómo sobrevive el patógeno, la duración de la rotación con un cultivo no hospedante y otros atributos del cultivo, como ser si produce compuestos antipatógenos o forma asociaciones con microorganismos beneficiosos (Hartman et al., 2015b). Por lo tanto, la utilización de variedades resistentes surge como un método más seguro económica y ambientalmente para el control de enfermedades (Dorrance et al. 2003; Resende et al., 2017; Sahoo et al., 2017). Fox y col. (2013) afirman que la incorporación de tecnología en la semilla mejora la producción de soja.

Actualmente algunos de los cultivares comerciales presentan resistencia a mildiu (*Peronospora manshurica* (Naumov) Syd.), mancha foliar ojo de rana (*Cercospora sojina* Hara) y cancro del tallo (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* F.A. Fernández) como se detalla en las páginas web de empresas comerciales de semillas (Hartman et al., 2015b). Sin embargo, no se han incorporado genes de resistencia en los cultivares comerciales de soja para muchos patógenos de tallo. La mejora genética de este cultivo ha generado, además, una alta vulnerabilidad del germoplasma tanto a factores bióticos como abióticos.

Es por ello que en el marco de esta tesis se tomaron como punto de partida una gran cantidad de progenitores, permitiendo este hecho, a vista de los resultados, poder disponer de la

variabilidad genética necesaria y representativa además de las actuales fuentes de resistencia accesibles para los programas de mejoramiento de soja. Se utilizó como punto de partida diversos germoplasmas de soja que presentaran diferencias en sus respuestas a varias cepas de *Dpc* (virulencia) en sucesivos años (ambientes) de evaluación (Pioli, et al., 2001; 2002a y b, 2003, 2006; 2009; López Achaval et al., 2014). A partir de estos progenitores se plantearon durante dos periodos de siembra, años 2013/14 y 2014/15, la realización de cruzamientos entre genotipos RxS y RxR. Para la preparación de la flor se siguió el protocolo propuesto por Woodworth (1932) y Weiss (1949), que sugieren utilizar como flores receptoras de polen aquellas en las cuales la antesis ocurrirá la mañana siguiente (pimpollo cerrado, con el color de los pétalos fácilmente visible), removiendo el cáliz y la corola. Posteriormente, con la ayuda de una pinza delgada, se realizó la castración eliminando las diez anteras. El paso subsiguiente consistió en la aplicación de polen fresco, proveniente de una flor en la que ha ocurrido la antesis, sobre el estigma expuesto. Mediante el retiro del estambre inmaduro en todas las flores que actuaron como receptoras de polen o femeninas se obtuvo un control adicional de polinizaciones cruzadas manualmente. Este trabajo extra, si bien implica mayor tiempo, permitió asegurar la efectividad de los cruzamientos realizados, ya que la aparición de vainas producto de autopolinizaciones aumenta de un 2 a un 30% si se omite la emasculación temprana (Weiss, 1949). En el esquema de hibridaciones planteado, los controles aplicados durante la emasculación, fecundaciones y el control de insectos se consideraron los adecuados para minimizar la polinización cruzada.

De un total de 875 hibridaciones realizadas se obtuvieron 312 cruzamientos efectivos y fértiles (35,66%). Considerando las combinaciones de cruzamientos posibles entre los distintos progenitores, de las 288 combinaciones RxS propuestas y realizadas, el 20,83% produjo cruzamientos efectivos y con vainas fértiles. Mientras que en el caso de las combinaciones de cruzamientos RxR, propuestas y realizadas, un 14,39% produjo cruzamientos efectivos y con vainas fértiles. La producción de semilla proveniente de cruzamientos RxS y sus recíprocos no mostró diferencias significativas entre los dos años de generación de semillas ($\chi^2= 3,799$; $P= 0,05$). Sin embargo, al evaluar la producción de semillas en cruzamientos RxS y RxR observamos que se obtuvo una mayor proporción de semillas RxS ($\chi^2 > 10,83$; $P < 0,001$) respecto a la generada por RxR. Los resultados obtenidos indican la posibilidad de la existencia de incompatibilidad cruzada homomórfica entre los padres seleccionados para hibridaciones cruzadas (cumplimiento del *OEL.a*).

Los atributos morfológicos diferenciales en los progenitores evaluados como marcadores morfológicos fueron observados de acuerdo a las segregaciones esperadas correspondientes para las filiales F_1 (observación fenotípica del carácter dominante) y F_2 segregante (observación de las respectivas variantes para el carácter). Dado que las diferencias que existen entre genotipos de soja es cada vez más pequeña, el rigor en el fenotipado de progenies es cada vez más alto (Resende et al., 2017). Sin embargo, no siempre estos atributos resultan útiles para detectar polimorfismos o diferencias entre progenitores debido a que las variedades utilizadas como parentales fueron seleccionadas por ser divergentes y polimórficas al carácter de interés en estudio, que fue R/S a la CTS-*Dpc*, y además poseen una gran relación genética, y por ende ocasionalmente tienen los mismos rasgos morfológicos. Por ello, se consideró primordial realizar la validación molecular de la dotación heterocigota e híbrida de los individuos F_1 en relación a sus progenitores.

A fin de continuar con aquellos individuos realmente híbridos (con dotación heterocigota) y darle certeza al avance de las generaciones segregantes derivadas, se utilizaron marcadores moleculares de tipo SNP para evaluar la F_1 . Debido a su robustez y un mayor acceso gracias a la reducción de sus costos, actualmente los marcadores SNP son la clase de marcadores más utilizados y prometedores (Unêda-Trevisoli et al., 2017). En base a la importancia y avances logrados por la aplicación de estas herramientas biotecnológicas al mejoramiento vegetal, es que en el marco de esta tesis se propuso la *aplicación temprana e innovadora* de marcadores moleculares específicos para *realizar la caracterización de la primera filial*, esto es la F_1 , permitiendo hacer más eficiente el proceso de selección desde el inicio del trabajo de mejoramiento en soja. La utilización de los marcadores moleculares SNP en etapas iniciales de la selección y mejora genética permitió ***obtener individuos F_1 cuya dotación heterocigota e híbrida fue validada molecularmente y aseguró avanzar de manera segura en las generaciones segregantes subsiguientes.***

Al analizar la caracterización molecular por SNP de cada par de progenitores se obtuvo información sobre tres aspectos interesantes de abordar: el grado de polimorfismo entre progenitores, la heterocigosis residual (Pierce, 2010) y la conversión de un alelo hacia uno de los progenitores (Otha, 2010) o efecto materno. Respecto al *grado de polimorfismo* detectado entre progenitores surge que el germoplasma Ge(13) está más relacionado o emparentado con el genotipo Ge(12) (Tabla 9B) que con el fondo genético del cultivar Ge(4) (Tabla 9A). Mientras que los genotipos más divergentes resultaron ser los cultivares estabilizados Ge(16)

y Ge(9) (Tabla 9C). En relación a la *heterocigosis residual detectada en los progenitores* a través de los loci caracterizados por los SNP polimórficos para 24 progenitores, se observó que los 3 genotipos Ge(4), Ge(16) y Ge(9) que son cultivares estabilizados y usados en diversos programas de mejoramientos no presentaron locus en estado de heterocigosis residual (Tablas 9A y 9C). Mientras que los genotipos Ge(13) y Ge(12) registraron 4 y 3 eventos de heterocigosis residual respectivamente (Tabla 9B), posiblemente debido a que son líneas experimentales aun no estabilizadas para algunos loci de su genoma. Asimismo, al caracterizar los individuos F_1 se observó una proporción de loci no heterocigotas, que duplican alguno de los alelos de uno de los progenitores (Tablas 9A, 9B, 9C); aunque en este estudio se observaron en mayor proporción aquellos loci similares al progenitor materno (efecto materno, coincidente con lo expuesto por Fehr y col. (1992); Dhaubhadel y col. (2003)). Otros autores explican estos eventos como resultantes de un proceso de *gene conversion heterozygous genotypes* (Otha, 2010).

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la aplicación adicional y complementaria de marcadores moleculares combinados con los controles clásicos (morfológicos y estructurales-histológicos), aportan rigurosidad e información adicional de relevancia sobre cada uno de los progenitores involucrados en los cruzamientos que enriquecen y fortalecen los resultados y su significado biológico. No obstante, es oportuno señalar que este mismo protocolo generó simultáneamente una significativa reducción de la diversidad, respecto a aquellas numerosas combinaciones originales, y sus respectivos cruzamientos RxS, RxR y sus recíprocos (Tabla 5). Así, se cumplió con uno de los objetivos propuestos (*OEI.b*), que es disponer de poblaciones validadas molecularmente en su dotación genética heterocigota e híbrida desde la primera filial, o sea a partir de los individuos F_1 y permitir avanzar de manera segura en las poblaciones segregantes F_2 y las respectivas generaciones F_3 y familias $F_{2:3}$.

Respecto a la obtención de semillas F_2 , se logró cosechar la totalidad de las plantas F_1 *sembradas y caracterizadas como híbridos verdaderos por marcadores moleculares*. Esto es, 69 plantas F_1 provenientes de cruzamientos RxS y 9 plantas F_1 provenientes de cruzamientos RxR. Al analizar los plantales de semilla F_2 obtenida de plantas F_1 derivadas de cruzamientos RxS se observó que el 43,48% de las plantas F_1 ($n= 30$ plantas F_1) produjo 100 semillas o más, el 36,23% de las plantas F_1 ($n= 25$) produjo entre 70 y 99 semillas, mientras que el 20,29% de las plantas F_1 ($n= 14$) restantes produjeron menos de 69 semillas. Al analizar los plantales de semillas F_2 obtenidas de plantas F_1 derivadas de cruzamientos RxR, el 55,56% de

las plantas F_1 ($n= 5$) produjo 100 semillas o más, el 33,33% de las plantas F_1 ($n= 3$) produjo entre 70 y 99 semillas, mientras que el 11,11% de las plantas F_1 ($n= 1$) restantes produjeron menos de 69 semillas. Lo antedicho permitió dar cumplimiento al **OE1.c**.

Considerando aquellas plantas provenientes de cruzamientos RxS, a partir de 18 combinaciones de cruzamientos (cruzamientos entre cada padre R con todos los padres S, para cada progenitor R propuesto), lo que consiste en el 52,94% de las combinaciones avaladas por marcadores moleculares, 5 (27,78%) de ellas produjeron más de 70 semillas, número de semillas mínimo recomendado necesarias para las Pruebas de Progenie. En el caso de las plantas provenientes de cruzamientos RxR, a partir de 3 combinaciones de cruzamientos (cruzamientos entre cada padre R con el resto de los padres R, para cada progenitor R propuesto), lo que consiste en el 50% de las combinaciones positivas por marcadores moleculares, ninguna de ellas produjo más de 70 semillas (Tablas 12 y 13B).

Al considerar los requisitos protocolares implementados (fecundaciones efectivas evaluadas por controles morfológicos y estructurales-histológicos y validación molecular de la heterocigosis de individuos de la F_1) durante todo el avance generacional del proceso de mejora, la producción de semillas F_1 y F_2 obtenidas resultaron en número suficiente para continuar con el proceso de multiplicación hasta obtener vainas y semillas F_3 , sólo para las interacciones provenientes de cruzamientos RxS. La validación molecular temprana de las F_1 como homocigotas o híbridos de sus progenitores por SNP y la metodología experimental de las respectivas poblaciones F_2 y F_3 derivadas de tales individuos (F_1 confirmados molecularmente) permitió realizar las Pruebas de Progenie de dos cruzamientos, COD 258 (Ge(13)xGe(4)) y COD 157 (Ge(13)xGe(12)) de manera efectiva ya que se logró la **caracterización fenotípica** que aportó la información necesaria para inferir la **caracterización genotípica** de sus progenitores o individuos F_2 (Tablas 16 y 17) y evaluar el ajuste de los valores teóricos esperados en contraposición con los observados (cumplimiento del **OE2.a**).

A partir de los resultados obtenidos, se propone la existencia de al menos un gen mayor simple de herencia mendeliana proveniente del cruzamiento Ge(13) x Ge(4), lo que constituye el Primer Reporte a nivel mundial sobre la detección e identificación de un gen de R para la enfermedad CTS causada por Dpc, (cumplimiento del **OE2.b**).

Si bien algunos autores, basados en que la patogénesis y los mecanismos de defensa de la planta a *Dpc* son complejos, sugirieron que la resistencia a *Dpc* podría estar gobernada de manera poligénica, dependiendo de la etapa de desarrollo del cultivo, y no de un solo gen en

particular (Sun et al., 2012); en el presente estudio *Rdc1* se caracterizó como un gen mayor de herencia simple mendeliana (Peruzzo et al., 2017b; 2018). Además, las familias F_{2:3} seleccionadas como resistentes para la interacción Ge(13) resistente x Ge(4) susceptible (COD 1-258-2) pueden ser útiles en el mejoramiento de la soja proporcionando la posibilidad de obtención de un cultivar con el carácter resistencia. En consecuencia, el proceso de detección de las fuentes de resistencia a *Dpc* en el germoplasma de soja hasta ahora no caracterizado para resistencia a esta enfermedad, la selección de los progenitores, la validación molecular temprana de las F₁ como heterocigotas e híbridos y la detección del gen de resistencia *Rdc1* a CTS causada por *Dpc*, constituye un hallazgo trascendental.

Considerando los análisis de ligamiento del gen *Rdc1* de resistencia a CTS-*Dpc* al carácter morfológico color de flor de la población F₂ de la interacción Ge(13)xGe(4), se observó que ambos locus segregan de manera independiente, es decir, se encuentran a más de 50 cM de distancia en el cromosoma 13 o en diferentes cromosomas.

Por otro lado, las poblaciones evaluadas con la misma cepa de *Dpc* para el cruzamiento entre el mismo padre Resistente, Ge(13) con otro padre susceptible, Ge(12), no segregaron de la misma manera esperada para el caso Ge(13)xGe(4). Dado que en la primera interacción evaluada las frecuencias fenotípicas se ajustaron a un gen de resistencia dominante de herencia mendeliana, se descarta la hipótesis de un gen de resistencia recesivo en el germoplasma de soja Ge(13). Una explicación alternativa para la segregación fenotípica del gen *Rdc1* en el germoplasma Ge(13) puede entenderse considerando que este gen presente penetrancia genética incompleta cuando interactúa con la cepa *Dpc16*. Se dice que la penetración de un gen de resistencia es reducida o incompleta cuando algunos individuos no expresan el rasgo, a pesar de que portan el alelo de resistencia (Pierce, 2010). El fondo susceptible en el que se segregaba el gen *Rdc1* influyó en el grado de penetrancia en esta interacción particular (población COD 1-157-1/2). La penetrancia depende de la cepa patógena, el fondo genético, las condiciones ambientales y las variaciones alélicas del gen de resistencia. En nuestro caso, la misma cepa del patógeno, *Dpc16*, fue utilizado en la totalidad de las inoculaciones e interacciones y las diferencias ambientales no constituyeron una posible causa de variación debido a que ambas poblaciones, COD 1-258-2 y COD 1-157-1/2, fueron evaluadas en el mismo invernadero y al mismo tiempo. Al analizar y comparar este caso con otras interacciones planta-patógeno inoculadas y expuestas a ocho cepas de *Dpm* causales de CTS-*Dpm*, dos genotipos portadores del mismo gen *Rdm4* (Tyler, 1996),

Hutcheson y Dowling mostraron diferente nivel de severidad y diferente comportamiento frente a CTS-*Dpm*, debido, entre otros factores, a la expresión diferencial del gen *Rdm4* en ambos fondos genéticos (Pioli et al., 2003). Para nuestro análisis el progenitor Ge(13)-R, portador del gen *Rdc1* para CTS-*Dpc*, presenta una instancia similar al caso de York-R / Essex que fueron la fuente portadora del *Rdm4* para CTS-*Dpm* para Hutcheson y Dowling (Tyler, 1996). Y de la misma manera que aquel progenitor usado como fuente de resistencia a CTS-*Dpm*, este progenitor resistente Ge(13) fue cruzado con dos genotipos susceptibles diferentes Ge(4) y Ge(12). Este contexto de análisis permite suponer que el plantel de semillas F₅ derivada de las poblaciones segregantes del COD 258 (Ge(13)-R x Ge(4)), que permitieron definir la herencia y la expresión de un gen simple y de herencia mendeliana (*Rdc1*), puede continuar el proceso de inoculación y selección en nuevas pruebas de patogenicidad con *Dpc16* y/u otras cepas de *Dpc* y lograr así un cultivar mejorado y estabilizado similar al obtenido para resistencia a CTS-*Dpm*. Por su parte, para analizar los resultados de COD 157 (Ge(13)xGe(12)), fue necesario indagar la segregación y expresividad del mismo gen de resistencia *Rdc1*. La expresividad se refiere a la variación en la expresión de un alelo cuando el nivel de expresión del fenotipo resistente es variable entre individuos que portan el mismo gen de R (Pierce, 2010; Chiesa et al., 2013). En el caso evaluado en este estudio, la proporción de individuos fenotípicamente Resistentes resultantes de las Pruebas de Progenie y sus ponderados F₂ en el Ge(13)xGe(12) fue menor a la esperada, aun tratándose del mismo gen *Rdc1*. La diferencia en expresividad sería producto de la combinación de los fondos genéticos en los que se expresa la resistencia ya que la cepa de *Dpc1* fue la utilizada en todas las interacciones (aportes complementarios a cumplimiento del **OE2.b**).

El desarrollo del protocolo experimental y la descripción de los resultados parciales obtenidos a través de las diferentes etapas del estudio, ponen de manifiesto que se cumplieron todos y los mismos pasos orientados a obtener filiales segregantes tanto a partir de cruzamientos RxS como RxR. Sin embargo, el cumplimiento del **OE2.c** fue alcanzado parcialmente debido a tres factores: la posible existencia de incompatibilidad cruzada monomórfica en el momento de producción de semilla, la baja cantidad de F₁ validadas molecularmente y la baja producción de semillas de aquellas plantas F₁ que habían sido validadas molecularmente como híbridos verdaderos.

CAPÍTULO V

Conclusiones

- La mejora genética de soja generó progresivamente el estrechamiento de la base genética de su germoplasma y de las fuentes potenciales de resistencia a estrés biótico y abiótico. Por ello, la selección amplia de progenitores de soja resistentes y susceptibles a partir de interacciones con diversas cepas *Dpc* permitió disponer de germoplasma con variabilidad genética y detectar al menos un gen de resistencia a CTS-*Dpc* para introgresar en programas de mejoramiento de soja. Los cruzamientos se lograron entre genotipos RxS, pero en menor medida y con baja cantidad de semillas para los cruzamientos RxR.
- Se obtuvieron cruzamientos efectivos y fértiles e individuos F₁ de dotación heterocigota e híbrida (RxS) validados molecularmente en una generación temprana por marcadores moleculares.
- Se logró desarrollar poblaciones segregantes F₂ sus respectivas F₃ y familias F_{2,3} a partir de individuos heterocigotas e híbridas (F₁) validados molecularmente.
- La caracterización fenotípica de las familias F_{2,3} (Pruebas de progenie) de los cruzamientos COD-258 (Ge(13)xGe(4)) y COD-157 (Ge(13)xGe(12)) permitió inferir la caracterización genotípica de sus individuos F₂ predecesores y determinar el tipo de herencia del gen de resistencia a CTS-*Dpc*.
- A partir de los resultados obtenidos, se propuso la existencia de al menos **un gen mayor simple de herencia mendeliana** a partir de Ge(13)-R x Ge(4)-S, constituyendo el *Primer reporte sobre la detección e identificación de un gen Rdc para la enfermedad CTS causada por D. phaseolorum var. caulivora*. La detección e identificación del gen *Rdc1* a CTS-*Dpc* y su introgresión en cultivares mejorados de soja constituye un avance trascendente en los planes de mejoramiento genético vegetal.

CAPÍTULO VI

Bibliografía

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press, London, United Kindom. 952 páginas.
- Alifrangis M., Enosse S., Pearce R., Drakeley C., Roper C., Khalil I.F., Nkya W.M., Ronn A.M., Theander T.G., Bygbjerg I.C. 2005. A simple, high-throughput method to detect Plasmodium. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 72(2): 155–162.
- Allard R.W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia, 24(10): 235–278.
- Allen T.W., and Malvick D.K. 2017. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. Plant Health Progress, 18: 19–27.
- Álvarez Gil C.M. 2011. Marker-assisted selection (MAS, Marker-assisted selection) in the genetic improvement of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Cultivos Tropicales, 32(2): 154–169.
- Athow K.L., and Caldwell R.M. 1954. A comparative study of Diaporthe stem canker and pod and stem blight of soybeans. Phytopathology, 44: 319–325.
- Backman P.A., Crawford M.A., White J., Thurlow D.L., and Smith L.A. 1981. Soybean stem canker: a serious disease in Alabama. Highlights of Agricultural Research – Alabama, Agricultural Experiment Station, 28(4): 6.
- Backman P.A., Weaver D.B., and Morgan-Jones G. 1985. Soybean stem canker: an emerging disease problem. Plant Disease, 69(8): 641–647.
- Benavidez R., Pioli R.N., Morandi E.N. 2010. Response of the edamame edible soybean germoplasm to *Diaporthe phaseolorum*, causal agents of soybean stem canker, in Argentina. Tropical Plant Pathology, 35(1): 1–11.
- Bhering L.L., De Azevedo Peixoto L., Cruz C.D. 2017. Parental Selection. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sediyaama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 131–148.
- Black B.D., Padgett G.B., Russin J.S., Griffin J.L., Snow J.P., Berggren G.T. 1996. Potential weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent for soybean stem canker. Plant Disease, 80(7): 763–765.
- Bologna S.B., Soldini D.O., Carreras J.J. 2006. Evaluación del potencial genético de germoplasma exótico de soja para incrementar el contenido de aceite en el grano. RIA, 35(2): 37–51.

- Bolsa de Comercio de Rosario. 2017. Boletín Informativo. Rosario, Argentina. 17 páginas.
- Bowers G., Ngeleka K., Smith O. 1993. Inheritance of SSC resistance in Crockett and Dowling. *Crop Science*, 33: 67–70.
- Bradley C.A., and Li S. 2006. First Report of Northern Stem Canker of Soybean Caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in North Dakota. *Plant Disease Notes*, 90(5): 687.
- Byth D.E. 1966. Hybridization and pollen germination in soybeans. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 6: 371–373.
- Caixeta E.T., Oliveira A.C.B., Brito G.G., Sakiyama N.S. 2009. Tipos de marcadores moleculares. In: *Marcadores Moleculares*. Borém A., Caixeta E.T. (Eds.). UFV, Viçosa, Brasil. Páginas 11–93.
- Calzada J., and Corina S. 2017. Argentina en el mercado mundial de granos y subproductos. Informativo Semanal nro. 1816. Bolsa de Comercio de Rosario. Rosario, Argentina. Páginas 5–7.
- Chiesa M.A., Pioli R.N., Morandi E.N. 2009. Specific Resistance to Soybean Stem Canker Conferred by the Rdm4 Locus. *Plant Pathology*, 58(69): 1032–1039.
- Chiesa M.A., Pioli R.N., Cambursano M.V., Morandi E.N. 2013. Differential expression of distinct soybean resistance genes interacting with Argentinean isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *European Journal of Plant Pathology*, 135(2): 351–362.
- 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(65): 1–12.
- Crall J.M. 1950. Soybean disease in Iowa in 1949. *Plant Disease Reporter*, 34: 96–97.
- Cruz C.D., Silva Rodrigues H., Silva Rosado R.D., Bhering L.L. 2017. Biometrics Applied to Soybean Breeding. In: *Soybean Breeding*. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 193–228.
- Cubero J.I. 2002. Introducción a la mejora genética vegetal. 2da Edición. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España. 565 páginas.
- Curl E.A. 1963. Control of plant diseases by crop rotation. *Botanical Review*, 29: 413–479.
- Cutler G.H. 1934. A simple method for making soybean hybrids. *Journal American Society of Agronomy*, 26: 252–254.

- Da Silva F.L., Ludke W.H., Del Conte M.V., Bueno T.V., Da Silva A.S.L. 2017. Methods for Advancing Segregating Populations. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 149–170.
- Debaeke P., and Moinard J. 2010. Effect of crop management on epidemics of phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi*) for susceptible and tolerant sunflower cultivars. Field Crops Research, 115(1): 50–60.
- Delannay X., Rodgers D.M., Palmer R.G. 1983. Relative genetic contribution among ancestral lines to North American soybean cultivars. Crop Science, 23: 944–949.
- Dorrance A.E., McClure S.A., DeSilva A. 2003. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* in Ohio soybean fields. Plant Disease, 87: 139–146
- Dos Santos Silva F.C., Sedyama T., Teixeira Oliveira R.C., Borém A, da Silva F.L., Gomes Bezerra A.R., da Silva A.F. 2017. Economic Importance and Evolution of Breeding. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 1–16.
- Dhaubhadel S., McGarvey B.D., Williams R., Gijzen M. 2003. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. Plant Molecular Biology, 53: 733–743.
- Echeverri A., Ceballos H., Vallejo FA. 1999. Análisis dialélico de algunos caracteres cuantitativos en pimentón (*Capsicum annuum* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 52(2): 611–642.
- FAO. 2017. FAOSTATS. <http://faostat.fao.org/> (visitado 13 Febrero, 2018).
- Faruqi A.F., Hosono S., Driscoll M.D., Dean F.B., Alsmadi O., Bandaru R., Kumar G., Grimwade B., Zong Q., Sun Z., Du Y., Kingsmore S., Knott T., Lasken R.S. 2001. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification. BMC Genomics, 2: 4.
- Fehr W.R., and Caviness C.E. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University Cooperative Extension Service, Special Report 80. 11 páginas.
- Fehr W.R., Welke G.A., Hammond E.G., Duvick D.N., Cianzio S.R. 1992. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean genotypes A16 and A17. Crop Science, 32: 903–906.

- Fernández F.A., and Hanlin R.T. 1996. Morphological and RAPD analysis of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, 88, 425–440.
- Flor HH. 1971. Currents status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopatology*, 9: 275–95.
- Fox C.M., Cary T.R., Colgrove A.L., Nafziger E.D., Haudenshield J.S., Hartman G.L., Specht J.E., Diers B.W. 2013. Estimating soybean genetic gain for yield in the Northern USA—Influence of cropping history. *Crop Science*, 53: 2473–2482.
- Fried G., Chauvel B., Reynaud P., Sache I. 2017. Impact of biological invasions on ecosystem services. In: *Decreases in crop production by non-native weeds, pests, and pathogens*. Vilà M., Hulme P.E. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 83–101.
- Giancola S.M. 1998. Caracterización y diferenciación de germoplasma de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) mediante marcadores moleculares. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires. 274 páginas.
- Gidner S., Lennefors B.L., Nilsson N.O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome*, 48(2): 279–285
- Graham P.H., and Vance C.P. 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131: 872–877.
- Grau C.R., Dorrance A.E., Bond J., Russin J. 2004. Fungal diseases. In: *Soybeans: Improvement, production and uses*. 3rd Edition. Boerma H.R., and Specht J.E. (Eds.). American Society of Agronomy. Madison, USA. Páginas 679–763.
- Grijalba P.E., and Guillin E. 2007. Occurrence of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the southern part of Buenos Aires province, Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 2: 65–66.
- Haerizadeh F., Wong C.E., Bhalla P.L., Gresshoff P.M., Singh M.B. 2009. Genomic expression profiling of mature soybean (*Glycine max*) pollen. *BMC Plant Biology*, 9: 25.
- Hanson W.D., and Weber C.R. 1961 Resolution of genetic variability in self-pollinated species with an application to the soybean. *Genetics*, 46: 1425–1434.
- Hartman G.L., Sinclair J.B., Rupe J.C. 1999. *Compendium of Soybean Diseases*. 4th Edition. APS Press. St. Paul, USA. 100 páginas.

- Hartman G.L., Rupe J.C., Sikora E.F., Domier L.L., Davis J.A., Steffey K.L. (Eds.). 2015a. Compendium of soybean diseases and pests. 5th Edition. APS PRESS. St. Paul, USA. 201 páginas.
- Hartman G.L., Bowen R.C., Haudenshield J.S., Fox C.M., Cary T.R., Diers B.W. 2015b. Evaluation of disease and pest damage on soybean cultivars released from 1923 through 2008 under field conditions in central Illinois. *Agronomy Journal*, 107: 2373–2380.
- Hartwig E.E., and Hinson K. 1962. Inheritance of flower color of soybeans. *Crop Science*, 2:152–153.
- Hernandez F.E., Pioli R.N., Peruzzo A.M., Formento A.N., Pratta G.R. 2015. Morphologic and molecular characterization of *Phomopsis longicolla* (teleomorph unknown: *Diaporthales*) from tempered and subtropical regions of Argentina. *Revista de biologia tropical*, 63(3), 871–884.
- Higley P.M., and Tachibana H. 1987. Physiologic specialization of DPC in soybean. *Plant Disease*, 71: 815–817.
- Hobbs T., and Phillips D. 1985. Identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* from soybean. *Phytopathology*, 75: 500.
- Hou P., Ji M., Li S., Lu Z. 2004. Microarray-based approach for high-throughput genotyping of single-nucleotide polymorphisms with layer-by-layer dual-color fluorescence hybridization. *Clinical Chemistry*, 50: 1955–1957.
- Hymowitz T., and Bernard R.L. 1991. Origin of soybean and germplasm introduction and development in North America. In: Use of plant introductions in cultivar development, Part 1. Shands H.L., Wiesner L.E. (Eds.). Crop Science Society of America Special Publication 17. Madison, USA. Páginas 149–167.
- Ingvarsdén C.R., Xing Y., Frei U.K., Lübberstedt T. 2010. Genetic and physical fine mapping of *Scmv2*, a potyvirus resistance gene in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(8): 1621–1634.
- Ivancovich, A. 1992. Enfermedades del tallo de soja. *Carpeta de Producción*, EE INTA Pergamino. 86 páginas.
- Johnson H.W., and Bernard R.L. 1962. Soybean genetics and breeding. *Advances in Agronomy*, 14: 149–221.

- Junghans D.T., Alfenas A.C., Brommonschenkel S.H., Oda S., Mello E.J., Grattapaglia D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 175.
- Keeling B.L. 1982. A seedling test for resistance to SSC caused by DPC. *Phytopathology*, 72: 807–809.
- Keeling B.L. 1984. Evidence for physiologic specialization in DPC. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences Supplement*, 29: 5.
- Keeling B.L. 1985. Soybean cultivar reactions to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and pathogenic variation among isolates. *Plant Disease*, 59: 132–133.
- Kilen T., and Hartwig E. 1987. Identification of single genes controlling SSC resistance. *Crop Science*, 27: 220–222.
- Keeling B.L. 1988a. Measurement of soybean resistance to stem canker caused by DPC. *Plant Disease*, 72: 217–220.
- Keeling B.L. 1988b. Influence of temperature on growth and pathogenicity of DPC isolates. *Plant Disease*, 72:220–222.
- Krawczak M. 1999. Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*, 20: 1676–1681.
- Kulik M.M. 1984. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non host plants by *P. batatae*, *P. phaseoli*, and *P. sojae* and the taxonomic implications. *Mycologia*, 76(2): 274.
- Lacadena J.R. 1976. *Genética*. 2º Ed. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Li M., Sha A., Zhou X., Yang P. 2012a. Comparative proteomic analyses reveal the changes of metabolic features in soybean (*Glycine max*) pistils upon pollination. *Sexual Plant Reproduction*, 25(4): 281–291.
- Li S., Smith J.R., Ray J.D., Frederick R.D. 2012b. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 133–142.
- López Achaval P., Jacobi S., Pacífico T., López S., Pratta G., Pioli R. 2014. Validación de la respuesta del germoplasma de *Glycine max* frente a cuatro cepas de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. In: XVI Congreso y XXXIV Reunión anual Sociedad de Biología Rosario. Rosario, Argentina. Página 75.

- Mateos-Aparicio I., Redondo Cuenca A., Villanueva-Suárez M.J., Zapata-Revilla M.A. 2008. *Nutrición Hospitalaria*, 23(4): 305–312.
- Matsuo É., Ferreira P.A., Sedyama T. 2017. Resistance to Diseases. In: *Soybean Breeding*. Da Silva F.L, Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 329–350.
- Mchale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7: 212.
- Morgan-Jones G. 1989. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: taxonomic considerations. In: *World Soybean Res. Conference IV Proceedings*. Pascale A.J. (Ed.). Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina. Páginas 1699–1706.
- Nuez F., Picó B., Iglesias A., Esteva J., Juárez M. 1999. Genetics of melon yellows virus resistance derived from *Cucumis melo* ssp. *Agrestis*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 453.
- Ohta T. 2010. Gene conversion and evolution of gene families: an overview. *Genes*, 1: 349–356.
- Olivier M., Chuang L.M., Chang M.S., Chen Y.T., Pei D., Ranade K., de Witte A., Allen J., Tran N., Curb D., Pratt R., Neefs H., de Arruda Indig M., Law S., Neri B., Wang L., Cox D.R. 2002. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology. *Nucleic Acids Research*, 30(12): e53.
- Pedersen W.L., and Leath S. 1988. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 369–378.
- Perry M.C., and Mcintosh M.S. 1991. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collections. I. Morphological traits. *Crop Science*, 31: 1350–1355.
- Peruzzo A., Pioli R.N., Formento N. 2008. Relaciones bio-morfológicas entre aislados del complejo *Diaporthe – Phomopsis* obtenidos en diversos ambientes del área agrícola de Argentina. In: *X Congreso y XXVIII Jornada Anual Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario, Argentina. Página 146.
- Peruzzo A., Maumary R., Olivanti M., Luna R., Pioli R. 2010a. Plasticidad patogénica de tres aislados del complejo *Diaporthe Phomopsis* en soja y girasol. In: *XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. La Plata, Argentina. Página 145.

- Peruzzo, A. 2010. Tesina: Bio-Genética fungica de *Diaporthe/Phomopsis*. Lic. Biot. FCByF, UNR. (Director RN Pioli; CoD E Gómez). Rosario, Argentina. 88 páginas.
- Peruzzo A., Pioli R.N., Cairo C., Pratta G., Ploper L.D. 2015. Obtención de la primera generación filial entre cultivares de soja para la identificación de genes de resistencia a Dpc. In: XVII Congreso y XXXV Reunión Anual Sociedad Biología Rosario. Rosario, Argentina. Página 202.
- Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017a. Segregación diferencial de la resistencia a cancro del tallo de soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) en cruzamientos que comparten el mismo progenitor resistente. In: IV Jornada Uruguay de Fitopatología – II Jornada Uruguay de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. Página 37.
- Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017b. First report on the identification and inheritance of an Rdc gene conferring resistance to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). In: IV Jornada Uruguay de Fitopatología – II Jornada Uruguay de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. Página 43.
- Peruzzo A.M., Hernández F.E., López Achaval P., Pratta G.R., Cairo C., Gosparini C., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017c. Avances y logros en la búsqueda de resistencia a la cancrrosis del tallo de soja causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. In: XI Jornada de Ciencia y Tecnología. Rosario, Argentina. En edición.
- Peruzzo A.M., Hernández F.E., Lima Brito Junior S., Malone G., Ploper L.D., Pioli R.N. 2017d. Marcadores moleculares de tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) para la validación de híbridos en la F₁ de cruzamientos para estudios de resistencia a la cancrrosis del tallo de la soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). In: 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina. Página 463.
- Peruzzo A.M., Hernández F.E., Pratta G.R., Ploper L.D., Pioli R.N. 2018. First report on the identification and inheritance of an Rdc gene conferring resistance to soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*). In: Ten World Soybean Research Conference. Savannah, USA. En edición.
- Pierce B.A. 2010. Genética. Un enfoque conceptual. 5ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 915 páginas.

- Pioli R.N., Porfiri A., Incremona M., Díaz C., Morata M. 1993. Determination of fungic diseases in soybean (*Glycine max*). Previous study of the evaluation of management methods. *Combined Biology*, 11: 156.
- Pioli R., Gattuso S., Prado D., Borghi A. 1997. Outbreak of soybean canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* in Santa Fe, Argentina. *Plant Disease*, 81: 1215.
- Pioli R.N., Morandi E.N., Gosparini C.O., Borghi A.L. 1999. First report on pathogenic variability of different isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* on soybean in Argentina. *Plant Disease*, 83, 1071.
- Pioli R.N. 2000-01. Informe sobre Situación del Complejo *Diaporthe Phomopsis* en Argentina y Trámites de Introducción de cepas. Presentación a SENASA Rosario. 11 páginas.
- Pioli R.N., Morandi E.N., Bisaro V. 2001. First report of soybean stem canker caused by *D. phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease Note*, 85(1): 95.
- Pioli R.N., Morandi E.N., Luque A., Gosparini C.O. 2002a. Recent outbreak of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the main soybean producing region of Argentina. *Plant Disease Note*, 86(12): 1403.
- Pioli R.N., and Morandi E.N. 2002b. Capítulo: *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* In: *Crop Protection Compendium*. McGillivray L. (Ed.). CAB International. Wallingford, UK. 19 páginas.
- Pioli R.N., and Morandi E.N. 2002c. *D. phaseolorum* var. *meridionalis*. *Crop Protection Compendium*. McGillivray L. (Ed.). CAB International. Wallingford, UK. 20 páginas.
- Pioli R.N., Morandi E.N., Martínez M.C., Lucca F., Tozzini A., Bisaro V., Hopp E., 2003. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*, 93(2): 136–146.
- Pioli, R. 2004. Caracterización morfológica y fisiológica de interacciones planta hospedante-patógeno de interés agrícola: *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* - *Glycine max*. Res. ESc. Graduados Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacia UNR. 148 págs. Director A. Borghi. 208 páginas.
- Pioli R.N., Cairo C.A., Morandi E.N. 2005. Prevalence of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* as causal agent of soybean stem canker, in Argentina. *Biocell*, 29(1): 141.

- Pioli R.N., and Morandi E.N. 2006. Situación del complejo *Diaporthe Phomopsis* en el cultivo de soja de Argentina. In: 3° Congreso de soja del Mercosur–Mercosoja. Rosario, Argentina. Páginas 325–331.
- Pioli R. 2007. Estudio de algunas estrategias parasitarias y de defensa vegetal desarrolladas en asociaciones fúngicas de importancia económica en el cultivo de soja y otros hospedantes. PID AGR. 100. Convocatoria UNR 2007. Res. CS 193/2007. 2007- 2010. Proyecto Interdisciplinario e Interinstitucional. 8 páginas.
- Pioli R.N., Cairo C.A., Martinez M.C., Benavidez R., Bisaro V., Maumary R., Morandi E.N. 2009. Morphological, molecular and pathogenic studies of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. In: World Soybean Research Conference VIII. Beijing, China. Página 157.
- Pioli R.N. 2011. *Diaporthe/Phomopsis*: Problema superado o amenaza latente?. Una mirada retrospectiva y actual para abordar el desafío próximo. In: Congreso MERCOSOJA. Rosario, Argentina. 5 páginas.
- Pioli R.N., Cairo C.A., Pratta G., Morandi E. 2012. Análisis de la resistencia a *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en dos fuentes de germoplasma de *Glycine max*. In: XV Congreso Latinoamericano de Genética. Rosario, Argentina. Página 262.
- Pioli R., Incremona M., Peruzzo A., Hernández F., Uboldi L., López Achával P., and Maumary R. 2014. Actualización sobre aspectos epidemiológicos y manejo genético de algunas enfermedades que afectan el tallo de soja. In: 3° Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán, Argentina. Página 136.
- Pioli R.N. 2016. Estudios sobre distribución de alelos sexuales map (*matting type*) en una población nativa de *Diaporthe –Phomopsis* asociada a cultivos de Argentina. Informe Final en el marco del Programa Pos-doctoración de la UNR. 02/12/2016. Rosario, Argentina. 101 páginas.
- Ploper L.D., Gonzalez V., Salas G., Devani M. 1997. Cancro del tallo: importante enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial*, 69: 3–7.
- Ploper L.D. 2004. Economic importance and control strategies for the major soybean diseases in Argentina. In: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja. Londrina, Brasil. Páginas 606–614.

- Ploper, L.D. 2011. Las enfermedades de la soja en Argentina. In: Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Muñoz, R. y M. Sillon (Eds.). Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, Argentina. Páginas 251–272.
- Ploper L.D. 2014. El cultivo de soja en el noroeste argentino, campaña 2013/2014. Publicación Especial EEAOC, 50: 8–9.
- Ploper L.D., González V., Reznikov S., Hecker L., De Lisi V., Henríquez D.D., Stegmayer C.A., Devani M.R. 2015. Evaluación de la eficiencia de fungicidas para el control de las enfermedades foliares de la soja en Tucumán, República Argentina. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán, 92(1): 01–15.
- Ragsdale D., Koch K., Grau C. 2008. Secondary effects of fungicides. In: Using of foliar fungicides to manage soybean rust. Dorrance A.E., Draper M.A., Hershman D.E. (Eds). Ohio State University. Ohio, USA. Páginas 83–85.
- Ramalho M.A.P., Bruzi A.T., Siqueira Teixeira R.D.K.. 2017. Quantitative Genetics in Breeding. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 113–130.
- Ranade K., Chang M.S., Ting C.T., Pei D., Hsiao C.F., Olivier M., Pesich R., Hebert J., Chen Y.D., Dzau V.J., Curb D., Olshen R., Risch N., Cox D.R., Botstein D. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. Genome Research, 11: 1262–1268.
- Resende M.D.V., Patto Ramalho M.A., Rodrigues Nunes J.A., Da Silva F.L., Souza Carneiro P.C. 2017. Blup in the genetic evaluation of parents, generations, populations, and progenies. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L, Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 229–252.
- Reyes Matamoros J.M., and Martínez Moreno D. 2001. La plasticidad de las plantas. Elementos, 41(8), 39–43.
- Rupe J.C., Sutton E.A., Becton C.M., Gbur J.R.E.E. 1999. Effect of soybean growth stage at the time of inoculation with *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionales* on stem canker development and yield. Plant Disease, 83(6): 582–586.
- Sahoo D.K., Abeysekara N.S., Cianzio S.R., Robertson A.E., Bhattacharyya M.K. 2017. A novel *Phytophthora sojae* resistance Rps12 gene mapped to a genomic region that contains several Rps genes. Plos one, 12(1): 1–14.

- Santos J.M., Correia V.G., Phillips A.J.L. 2010. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species. *Fungal Biology* 114: 255–270.
- Santos J.M., and Phillips A.J.L. 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34: 111–125.
- Scandiani, M., Ferri, M., Luque, A., Ruberti, D., Leiva, M., Bottai, H., Pioli, R.N. 2009. Inoculation of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. In: V° Congresso Brasileiro de Soja, MERCOSOJA. Goiania, Brasil. Página 164.
- Schmitthenner A.F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root-rot of soybean. *Plant Disease*, 69: 362–368.
- Semagn K.; Babu R.; Hearne S.; Olsen M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 33: 1–14.
- Smith E.F., and Backman P.A. 1989. Epidemiology of soybean stem canker in the south eastern United States: relationship between time of exposure to inoculum and disease severity. *Plant Disease*, 73(6): 464–468.
- Snow J.P., Berggren G.T., Harville B.G., Whitam H.K. 1984. Stem canker: a soybean disease recently found in Louisiana. *Louisiana Agriculture*, 27(8): 9–24.
- Staskawicz B.J., Ausubel F.M., Baker B.J., Ellis J.G., Jones J.D. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661–67.
- Sun S., Van K., Kim M.Y., Min K.H., Lee Y., Lee S. 2012. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, a causal agent for both stem canker and seed decay on soybean. *Plant Pathology Journal*, 28(1): 55–59.
- Sun J., Li L., Zhao J., Huang J., Yan Q., Xing H., Guo N. 2014. Genetic analysis and fine mapping of *Rpsjs*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 913–919.
- Thickett K., Vanderwal J., Lovett-doust L., Anderson T.R. 2007. A method for screening soybean seedlings for resistance to northern stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(2): 443–447.
- Tyler J.M. 1996. Characterization of stem canker resistance in “Hutcheson” soybean. *Crop Science*, 36: 591–593.

- Unêda-Trevisoli S.H., Mota Da Silva F., Di Mauro A.O. 2017. Marker-assisted selection and genomic selection. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 275–292.
- Vallejo Cabrera F.A., and Estrada Salazar E.I. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 403 páginas.
- VanderPlank J.E. 1963. Plant diseases. Epidemics and control. Academic Press. New York, USA. 349 páginas.
- Vanderplanck J.E. 1978. Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. 169 páginas.
- Van Rensburg J.C.J., Lamprecht S.C., Groenewald J.Z., Castlebury L.A., Crous P.W. 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in south Africa. *Studies in Mycology*, 55: 65–74.
- Verneti D.J.F., and Verneti Júnior D.J.F. 2017. Qualitative traits in breeding. In: Soybean Breeding. Da Silva F.L., Borém A., Sedyama T., Ludke W. (Eds.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland. Páginas 55–80.
- Weiss M.G. 1949. Soybeans. *Advances in Agronomy*, 1: 90-97.
- Welch A., and Gillman J. 1948. hetero- and homo-thallic types of *Diaporthe* in soybeans. *Phytopatology*, 38: 628–637.
- Woodworth C.M. 1932. Genetics and breeding in the improvement of the soybean. *Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin*, 384: 297–404.
- Wrather J.A., Anderson T.R., Arsyad D.M., Gai J., Ploper L.D., Porta-Puglia A., Ram H.H., Wrather J.A, Shannon G., Balardin R., Carregal L., Escobar R., Gupta G.K., Tenuta A. 2010. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress*, 10: 1094.
- Yan F., Di S., Rojas Rodas F., Rodriguez Torrico T., Murai Y., Iwashina T., Anai T., Takahashi R. 2014. Allelic variation of soybean flower color gene w4 encoding dihydroflavonol 4-reductase 2. *BMC Plant Biology*, 14(58): 1–12.
- Yang K., Jeong N., Moon J., Lee Y., Lee S., Mook Kim H., Ho Hwang C., Back K., Palmer R.G., Jeong S. 2010. Genetic analysis of genes controlling natural variation of seed coat and flower colors in soybean. *Journal of Heredity*, 101(6): 757–768.

- Ybram R.G., and Lacelli G.A. 2016. Informe estadístico mercado de la soja. Boletín INTA. Buenos Aires, Argentina. 9 páginas.
- Yoon M.S., Song Q.J., Choi I.Y., Specht J.E., Hyten D.L., Cregan P.B. 2007. BARC SOY SNP23: a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(5): 885–899.
- Yorinori J.T. 1996. Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle. Circular técnica. Embrapa-CNPSo. Londrina, Brasil. 78 páginas.
- Yorinori J.T., Yuyama M.M., Siqueri F.V. 2009. Doenças da soja. In: Boletim de pesquisa de soja 2009 (Boletim, 13). Galhardi Jr. A., Siqueri F., Caju J.E., Camacho S. (Eds.). Fundação MT, Rondonópolis, Brasil. Páginas 180–222.
- Yu Y.G., Saghai Maroof M.A., Buss G.R., Maughan P.J., Tolin S.A. 1993. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology*, 84: 60–64.
- Zhang A.W., Riccioni L., Pederson W.L., Kollipara K.P., Hartman G.L. 1998. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology*, 88: 1306–1314.
- Zhang A.W., Hartman G.L., Curio-Penny B., Pedersen W.L., Becker K.B. 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology*, 89(9): 796–804.
- Zohary, D. 1970. Centers of diversity and centers of origin. In: Genetic resources in plants - their exploration and conservation. Frankel O.H., and Bennett E. (Eds.) Blackwell Scientific. Oxford, United Kingdom. Páginas 33–42.