



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

OBTENCIÓN ACELERADA DE VARIETADES DE ARVEJA (*Pisum sativum L.*) POR MÉTODOS CONVENCIONALES Y NO CONVENCIONALES.

Ing. Agr. FEDERICO CAZZOLA

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. ENRIQUE COINTRY

CO- DIRECTOR: Dra. CAROLINA BERMEJO

AÑO 2022

**OBTENCIÓN ACELERADA DE VARIEDADES DE ARVEJA (*Pisum sativum L.*) POR
MÉTODOS CONVENCIONALES Y NO CONVENCIONALES.**

Federico Cazzola

Ingeniero Agrónomo – 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 esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre Junio de 2017 y Noviembre de 2021, bajo la dirección del Dr. Enrique Cointry y la co-dirección de la Dra. Carolina Bermejo.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma del Co - Director

Defendida: 29 de Junio de 2022.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera me ayudaron y brindaron su apoyo durante la carrera... Gracias!!

Al Dr. Enrique Cointry, por haberme elegido, permitido formar parte de su grupo de investigación, por todo el apoyo, los consejos, la orientación y la atención a todas mis consultas.

A la Dra. Carolina Bermejo, por el apoyo, la ayuda, los consejos y el tiempo brindado.

A mi familia, por permitirme ser quien soy, por el apoyo incondicional en todo momento, su ayuda, contención, por darme la posibilidad de estudiar y por todos los valores que siempre me inculcaron... Gracias!

A mi novia Vane, por todo el amor incondicional, el apoyo y la contención en todo momento. Gracias mi amor te amo!

A todos los integrantes de la Catedra de Mejoramiento, por los consejos, el tiempo compartido, la ayuda y el apoyo brindado.

A todo el personal de la Facultad, Becarios e Investigadores por el apoyo, la ayuda y los consejos durante la carrera.

A mi hermoso país, por permitirme desde hace más de 25 años, poder desarrollarme, estudiar e investigar, brindándome educación pública y de calidad!

PUBLICACIONES

CAZZOLA F, BERMEJO C, GATTI I, COINTRY E. Speed breeding in pulses: an opportunity to improve the efficiency of breeding programs. Crop and Pasture Science 72, 165-172 (2021). <https://doi.org/10.1071/CP20462>

GUINDON F, **CAZZOLA F**, PALACIOS T, GATTI I, BERMEJO C, COINTRY E. **Biofortification of pea (*Pisum sativum* L.): A Review.** Journal of the Science of Food and Agriculture 101(9), 3551-3563 (2021).

GUINDON F, **CAZZOLA F**, BERMEJO C, ESPOSITO A, COINTRY, E. **Complementary tools utilized in the pea (*Pisum sativum* L.) breeding program at Universidad Nacional de Rosario.** BAG. Journal of Basic and Applied Genetics Vol XXXII Issue 2: 24-30. (2021).

GATTI I, **CAZZOLA F**, BERMEJO C, GUINDON F, ESPOSITO A, COINTRY, E. **Pea (*Pisum sativum* L.) breeding: advances of the breeding program at Universidad Nacional de Rosario.** BAG. Journal of Basic and Applied Genetics Vol XXXII Issue 2: 14-22. (2021).

CAZZOLA, F., BERMEJO, C.J., GUINDON, M.F.; COINTRY, E. Speed breeding in pea (*Pisum sativum* L.), an efficient and simple system to accelerate breeding programs. Euphytica 216, 178 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02715-6>.

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.J.; COINTRY, E. Transgressive segregations in two pea F_2 populations and their respective $F_{2:3}$ families. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v.55, e01623 (2020). <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01623>.

BERMEJO, C.; GUINDON, M.F.; PALACIOS, L.; **CAZZOLA, F.**; GATTI, I.; COINTRY, E.; **Comparative androgenetic competence of various species and genotypes within the genus *Pisum* L.** Plant Cell Tissue and Organ Culture. (2020). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01934-y>.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.; COINTRY, E. *Speed breeding* en arveja (*Pisum sativum* L.) XLVIII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Genética. 24 al 26 de septiembre 2020.

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.; COINTRY, E. Aceleración de generaciones *in vitro* – *in vivo* e *in vivo* en arveja (*Pisum sativum* L). XLVIII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Genética. 24 al 26 de septiembre 2020.

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.; COINTRY, E. Selección de familias transgresivas a partir de análisis de variabilidad en dos poblaciones F₂ de arveja (*Pisum sativum* L.) y sus correspondientes familias F_{2:3}. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre 2019.

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.; COINTRY, E. Análisis de variabilidad en dos poblaciones F₂ de arveja (*Pisum sativum* L.). XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 27 y 28 de Noviembre 2018.

CAZZOLA, F.; BERMEJO, C.; COINTRY, E. Aplicación de una tecnología de aceleración de generaciones en arveja (*Pisum sativum* L.) basada en un sistema hidropónico y rescate de embriones. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 27 y 28 de noviembre 2018.

INDICE

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	- 9 -
2. RESUMEN.....	- 11 -
3. ABSTRACT.....	- 13 -
4. INTRODUCCIÓN.....	- 15 -
4.1 Origen.....	- 15 -
4.2 Taxonomía.....	- 15 -
4.3 Descripción Botánica.....	- 16 -
4.4 Producción y comercio mundial.....	- 18 -
4.5 Mejoramiento genético de arveja.....	- 20 -
4.6 Variabilidad genética en mejoramiento convencional.....	- 22 -
4.6.1 Marcadores Morfológicos.....	- 23 -
4.6.2 Marcadores Bioquímicos.....	- 24 -
4.6.3 Marcadores de ADN.....	- 24 -
4.7 Método de conducción y selección de poblaciones segregantes.....	- 25 -
4.8 Alternativas para mejorar la eficiencia de los programas de mejora de arveja..	- 25 -
4.8.1 Tecnología <i>Speed breeding</i>	- 29 -
5. HIPÓTESIS.....	- 32 -
6. OBJETIVOS.....	- 32 -
6.1 Objetivo general.....	- 32 -
6.2 Objetivos específicos.....	- 32 -
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 33 -
7.1 Caracterización de las variedades utilizadas como parentales y del efecto ambiental..	-33-
7.1.1 Material vegetal.....	- 33 -
7.1.2 Análisis fenotípico.....	- 34 -
7.1.3 Análisis estadístico.....	- 34 -

7.2	Análisis de la variabilidad genética presente en las poblaciones F_2 y $F_{2.3}$	- 35 -
7.2.1	Material vegetal.....	- 35 -
7.2.2	Análisis fenotípico.....	- 36 -
7.2.3	Análisis estadístico.....	- 37 -
7.3	Evaluación de metodologías de aceleración de generaciones.....	- 38 -
7.3.1	Metodología <i>in vitro</i>	- 38 -
7.3.2	Metodología <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	- 39 -
7.3.3	Metodología <i>in vivo</i>	- 41 -
7.3.4	Selección del método.....	- 42 -
7.3.5	Poblaciones segregantes.....	- 42 -
7.3.6	Análisis estadístico para la evaluación de las diferentes metodologías.....	- 42 -
7.4	Análisis de la variabilidad de las Rils obtenidas por ambos métodos.....	- 43 -
7.4.1	Siembra de las Rils.....	- 43 -
7.4.2	Análisis estadísticos.....	- 43 -
8.	RESULTADOS.....	- 46 -
8.1	Caracterización de las variedades utilizadas como parentales y del efecto ambiental en los diferentes años de evaluación.....	- 46 -
8.2.	Análisis de la variabilidad genética presente en las poblaciones F_2 y $F_{2.3}$	- 50 -
8.2.1	Población F_2	- 50 -
8.2.2	Población $F_{2.3}$	- 52 -
8.2.3	Heredabilidades.....	- 57 -
8.2.4	Análisis componentes principales F_2 y $F_{2.3}$	- 59 -
8.3	Aceleración de generaciones.....	- 63 -
8.3.1	Método <i>in vitro</i>	- 63 -
8.3.2	Método <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	- 64 -
8.3.3	Método <i>in vivo</i>	- 66 -
8.3.4	Evaluación del método <i>in vivo</i> sobre población segregantes.....	- 69 -

8.4 Análisis de la variabilidad de las Rils obtenidas por los diferentes métodos.....	- 72 -
8.4.1 Análisis de Rils transgresivas.....	- 82 -
8.4.2 Análisis de conglomerados de las Rils.....	- 83 -
9. DISCUSIÓN.....	- 87 -
10. CONCLUSIONES.....	- 105 -
11. BIBLIOGRAFÍA.....	- 107 -
12. ANEXO.....	- 119 -

1. Abreviaturas y símbolos

%T: Porcentaje de individuos transgresivos.

AC: Antes de cristo.

ACP: Análisis de componentes principales.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANDEVA: Análisis de varianza.

AP: Altura de planta.

cm: Centímetros.

CM: Cuadrado medio.

CP: Componentes principales.

CV: Coeficiente de variación.

DDP: Días después de polinización.

DF: Días a floración.

DH: Tecnología de dobles haploides.

F₁: Generación filial 1.

F₂: Generación filial 2.

F_{2,3}: Generación filial 2.3.

FBN: Fijación biológica de nitrógeno.

Flur: Flurprimidol.

g: Gramos.

GL: Grados de libertad.

GMO: Organismo genéticamente modificado.

GR: Grupo.

H₂: Heredabilidad en sentido amplio.

IGA: Interacción genotipo x ambiente.

IT: Índice de transgresividad.

LV: Largo de vaina.

m: Metros.

MS: Medio Murashige & Skoog.

Mt: Millones de toneladas.

N₂: Nitrógeno.

NG: Numero de granos total.

NG/P: Numero de granos por planta.

NG/V: Numero de granos por vaina.

NV: Numero de vainas.

NV/P: Numero de vainas por planta.

P: Peso total de granos.

SB: *Speed breeding*.

SSD: Método de descendencia de semilla única.

R: Rango.

Rils: Líneas endogámicas recombinantes.

UPOV: Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales.

2. Resumen

La arveja es una importante legumbre de estación fría. Se caracteriza por su alto contenido de proteínas, fibras, vitaminas y minerales lo que la convierten en un componente esencial de la dieta humana. Además, tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico reduciendo de esta manera la dependencia hacia los fertilizantes, contribuyendo a una agricultura más sostenible. Un desafío importante para los mejoradores del cultivo de arveja es el incremento del potencial de rendimiento y la estabilidad de la producción. El fitomejoramiento es un proceso lento. Desde el cruzamiento entre las variedades parentales seleccionadas, son necesarias 4-6 generaciones de endocria para generar líneas genéticamente estables y poder así proceder a la evaluación de sus características agronómicas. Esto implica que el desarrollo de nuevas variedades puede requerir una década o más, usando las metodologías tradicionales. Por esta razón, se intenta, en la actualidad, acelerar dicho proceso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar y desarrollar diferentes metodologías del sistema SSD: SSD *in vitro*, SSD *in vitro-in vivo* y SSD *in vivo* con el fin de determinar cuál de ellos es el más factible y eficiente para ser incorporado al programa de mejora. Estas variantes se probaron primero sobre variedades, y luego se evaluó la metodología seleccionada sobre dos poblaciones segregantes. Se evaluó la variabilidad de las poblaciones segregantes sobre las primeras generaciones (F_2 y $F_{2.3}$) sembradas a campo, para determinar la variabilidad del material de partida. Se utilizó los CV como medida de variabilidad lo que dieron valores elevados para ambas poblaciones excepto para los caracteres DF y LV. El IT mostro la aparición de segregantes transgresivos en la mayoría de los caracteres. Cuando se analizó el porcentaje de individuos transgresivos, todos los caracteres presentaron en mayor o menor medida segregantes transgresivos, siendo AP, NV, NGP y P para la población verde y NV, NGP, NG/V y P para la población amarilla los que demostraron mayores valores. Estos datos demostraron la gran variabilidad de partida de ambas poblaciones. Con respecto a los métodos evaluados, el método *in vitro* no mostró resultados alentadores ya que se obtuvieron muy pocas plantas con formación de flores. El método *in vitro-in vivo* resultó en un ciclo promedio de 88 días y

una eficiencia del 68% para las variedades evaluadas, lo que comparada con sistema convencional a campo mostró resultados prometedores. Sin embargo, el costo involucrado en la técnica *in vitro* es considerable debido a los requisitos de equipos específicos, los medios de cultivos y la mano de obra especializada. El sistema completamente *in vivo* demostró ser el más eficiente y con un ciclo total de 76 días, lo cual es beneficioso ya que además sus costos son menores en comparación a los sistemas que incluyen metodologías *in vitro*. Por este motivo, fue el sistema seleccionado. El sistema *in vivo* consiste en un sistema hidropónico, con un fotoperiodo de 22 h, provisto por tubos fluorescentes, temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, antigiberelina flurprimidol y cosecha anticipada de vainas. Las poblaciones segregantes conducidas a través del esquema SSD a campo tuvieron una eficiencia del 66%. Mientras tanto, el método *in vivo* es un sistema de ambiente controlado por lo que la eficiencia fue mayor (76%) lo que, además, permite al mejorador una mayor flexibilidad en la generación de nuevos materiales mejorados. No solo es importante evaluar las metodologías por la capacidad de aumentar el número de generaciones por año, sino que también, se requiere evaluar la eficiencia en la conservación de la variabilidad genética de los materiales segregantes. Al evaluar las Rils, tanto las obtenidas por el método convencional SSD a campo, como las obtenidas por el método *in vivo*, la variabilidad resultó ser similar, demostrando resultados alentadores para este método SSD modificado. En estos análisis, los valores medios y los CV de los caracteres de las Rils obtenidas por ambos métodos, mostraron valores similares. El análisis de componente principales y los diagramas de perfiles multivariado, permitieron observar que las distribuciones de las diferentes Rils obtenidas por ambos métodos muestran distribuciones similares. El análisis de conglomerados permitió, además, seleccionar materiales prometedores, provenientes del SSD convencional y el SSD *in vivo*. Teniendo en cuenta además la conservación de la variabilidad genética, el sistema *in vivo* demuestra grandes ventajas y potencialidad para su uso en los programas de mejora.

Palabras clave: Arveja, Aceleración de generaciones, Variabilidad genética, *Speed breeding*.

3. ABSTRACT

“ACCELERATE BREEDING IN PEAS (*Pisum sativum* L.) BY CONVENTIONAL AND NON-CONVENTIONAL METHODS”

Pea (*Pisum sativum* L.) is a major cool-season pulse crop and an essential component of sustainable cropping systems. Plant breeding based in conventional methods is a slow process. In fact, developing new varieties of crops such as pea needs a decade or more, using traditional methodologies. Shortening plant cycles allows to increase the efficiency of the programs. The objective of this work is to compare different rapid generation technologies on commercial varieties, then apply the most efficient on two segregating populations in order to develop a simple and low cost speed breeding system in pea.

The variability of the segregating populations on the first generations (F_2 and $F_{2.3}$) sown in the field was evaluated, to determine the variability of the starting material. CV were used as a measure of variability, which gave high values for both populations except for the DF and LV characters. The IT showed the appearance of transgressive segregating in most of the characters. When the percentage of transgressive individuals was analyzed, all the characters presented transgressive segregating to a greater or lesser extent, being AP, NV, NGP and P for the green population and NV, NGP, NG/V and P for the yellow population those that showed higher values. These data demonstrated the great starting variability of both populations.

Three methods were evaluated. One completely in vitro that gave very poor results. An in vitro–in vivo system, which shortened the varieties cycles with an intermediate efficiency, and an in vivo method that also shortened the cycles and was selected for its greater efficiency (51–95%) and lower cost. It consisted in a hydroponic system, with a 22-h photoperiod supplied by fluorescent T5 tubes, a temperature of 20 ± 2 °C, flurprimidol antigiberelin and early grain harvest. This method applied to segregating populations presented higher efficiencies than the traditional SSD in the field achieving up to five generations per year. When evaluating the Rils, both those obtained by the conventional field SSD method, and those obtained by the in vivo method, the variability turned out to be similar, showing encouraging results for this modified

SSD method. In these analyzes, the mean values and CV of the Rils characters obtained by both methods showed similar values. In the principal component analysis graphs and in the multivariate profile diagrams, it is possible to observe that the distributions of the different Rils obtained by both methods show similar distributions.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Origen

La arveja (*Pisum sativum* L.) es uno de los cultivos domesticados más antiguos del mundo. La fecha más temprana de su descubrimiento en sitios arqueológicos, corresponde a los 7.000 a 6.000 años AC en la franja territorial que comprende Turquía e Irán, y posteriormente (1.000 a 2.000 años AC) en Grecia y Europa (Zohary y Hopf, 1973; Ambrose, 1995). Según Cousin (1997), la arveja probablemente se originó en Abisinia y Afganistán, colonizando más tarde el área mediterránea, extendiéndose desde estas áreas a otras partes de Europa y Asia.

Antes de ser cultivada, junto con el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), era parte de la dieta cotidiana de los cazadores recolectores en el final de la última Edad de Hielo en el Medio Oriente y Europa, trayendo estabilidad a las tribus nómades y facilitando su establecimiento permanente. En Medio Oriente, Asia Central, incluido Afganistán, el Mediterráneo y Etiopía, abundan formas primitivas que son fuentes de diversidad genética (Khan y Croser, 2004). Desde allí fueron necesarios al menos, siete eventos de dispersión hacia América, para explicar los patrones de distribución actual de todas las legumbres, incluida la arveja (Schaefer et al., 2012).

En Sudamérica la dispersión puede haber ocurrido dos veces desde el Mediterráneo y una vez vía América del Norte (Schaefer et al., 2012). Posteriormente, por siglos de selección y mejora, miles de variedades fueron desarrolladas y, actualmente, se conservan en numerosas colecciones de germoplasma en todo el mundo (Smýkal et al., 2011, Smýkal et al., 2012, 2015). Los cambios con la domesticación incluyeron el desarrollo de semillas más grandes, pérdida de la dehiscencia de la vaina y un hábito compacto más corto (Davies, 1976).

4.2 Taxonomía

El género *Pisum* pertenece a la familia *Leguminosae*, que constituye la tercera familia más grande de las Angiospermas, con más de 750 géneros y 20.000 especies distribuidas por todo

el mundo (Upadhyaya et al., 2011). La clasificación dentro del género *Pisum* ha cambiado con el tiempo. Inicialmente se reconocían cinco especies (Govorov, 1937), mientras que actualmente se reconocen dos: *P. sativum* y *P. fulvum* (Smýkal et al., 2015; Warkentin et al., 2015). En base a estudios morfológicos y genéticos, *P. fulvum* fue identificado como germoplasma silvestre, debido a que las plantas poseen vainas dehiscentes y latencia de semillas, características necesarias para la supervivencia natural, pero no deseadas en un cultivo domesticado. En cambio, dentro de *P. sativum* se encontraron variedades domesticadas y silvestres (Warkentin et al., 2015).

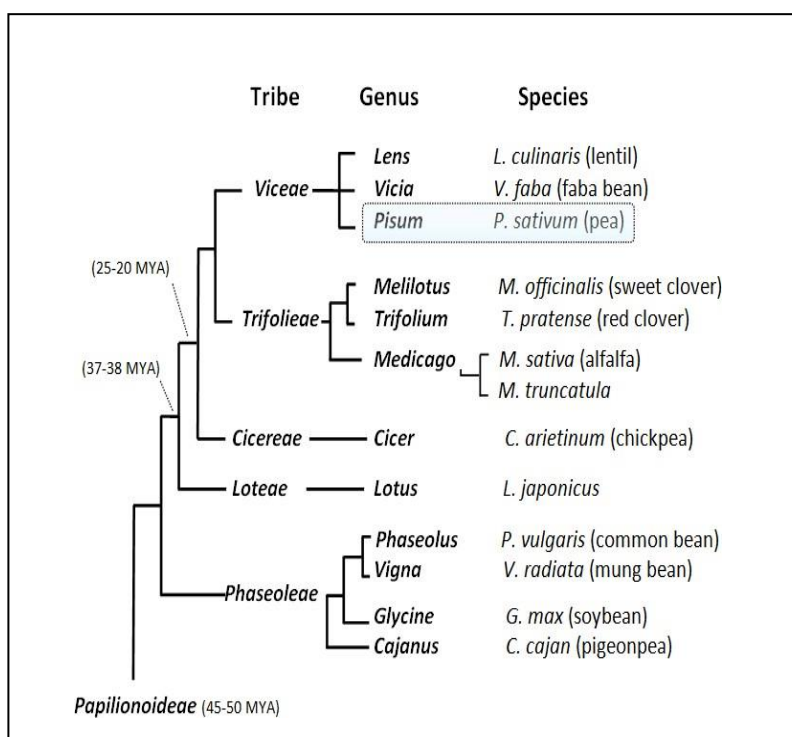


Figura 1: Relación taxonómica de los dos mayores clados de las legumbres cultivadas. MYA: Million Years Ago (adaptado de Choi et al., 2004).

4.3 Descripción Botánica

La arveja (*P. sativum* L.) (Figura 2), es una especie diploide ($2n = 14$ cromosomas), autógena, anual y herbácea.

El tamaño de la planta varía de 25 a 250 cm, siendo, las distintas variedades, de porte enano (25-70 cm de altura); de media rama (70-100 cm) y de enrame (más de 100 cm) (Brandan y Ploper, 1999). La raíz es pivotante con numerosas raíces laterales y presenta nódulos que

contienen bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico pertenecientes mayoritariamente a la familia de las *Rhizobiaceae*. Los tallos son trepadores, angulosos y ligeramente estriados. Sus hojas son compuestas y paripinadas, y constan de tres estructuras básicas: las estípulas, los folíolos y los zarcillos. Las estípulas, de tamaño mayor que los folíolos, se insertan en la base del pecíolo de la hoja (Brandan y Ploper, 1999). Hay variedades que se denominan semi-áfidas, en las que los folíolos están transformados en zarcillos (Goldenberg, 1965), por tanto, poseen una disminución del área foliar. Asimismo, existen variedades áfidas que además de poseer folíolos transformados en zarcillos poseen estípulas muy pequeñas.

Las flores son pentámeras blancas, moradas, salmón, naranja o verdes, con nacimiento individual o en racimos de una o dos flores en las axilas de las hojas. El cáliz gamosépalo presenta cinco sépalos de color verde pálido, los cuales son muy persistentes. La corola está formada por cinco pétalos irregulares llamados alas, estandarte y quilla y presenta coloración blanca, morada, salmón, naranja o verde (Alfonso, 2001).

Los frutos son vainas alargadas y oblongas de diferentes tonos de verde o moradas. Las vainas son algo comprimidas y terminan en una pequeña curva. Su tamaño es muy variable (entre 3 y 15 cm) y pueden contener entre dos a once granos (Brandan y Ploper, 1999). Según Gent (1988) el número de granos se considera bajo cuando varía entre dos y cuatro, medio cuando oscila entre cinco y seis, y alto cuando es superior a siete. Estos granos pueden ser lisos o rugosos y con color de cotiledón, verde, amarillo o naranja. Por otra parte, la disposición de las semillas dentro de la vaina puede ser: espaciada (las semillas adyacentes prácticamente no se tocan), medio compacta (las semillas se tocan, pero no se comprimen), comprimidas (las semillas se tocan una a otra y se comprimen), y muy comprimidas (entre tres y seis semillas pegadas). El peso de 100 semillas varía entre 14 g y más de 30 g (Brandan y Ploper, 1999).



Figura 2: Imagen de planta de arveja. Extraído de HLA - (Herbarium, Library, Art and Archives), Royal Botanic Gardens, Kew.

4.4 Producción y comercio mundial

La arveja es una importante legumbre de estación fría y un componente esencial de los sistemas de cultivo sostenibles (Duc et al., 2010; Jensen et al., 2012). En 2018, la arveja seca representó la tercera producción de cultivos de legumbres secas más importante después del poroto común y el garbanzo, con 13.3 Mt producidos en todo el mundo (FAOSTAT, 2020). La demanda de arveja es alta y sostenida dado el gran consumo en países de Asia como India, China y Bangladesh, que son los principales compradores del mundo. El mayor exportador a nivel global es Canadá y le siguen por volumen Rusia y EE.UU y en un rango inferior Francia y Australia. En Sudamérica el principal productor y exportador de arvejas es Argentina (Janzen et al., 2014). Además, las últimas tendencias sobre los alimentos a base de proteína vegetal han aumentado la demanda y el interés de las legumbres como la arveja.

En nuestro país el área sembrada alcanzó una superficie de 98.722 hectáreas durante el 2018 y la producción fue de 109.736 toneladas (FAOSTAT, 2020). Cabe señalar, que las siembras en un principio se localizaron en la zona núcleo de la región pampeana, conformada por el sudeste de Santa Fe y el norte de Buenos Aires, pero en los últimos años se extendió la propuesta productiva a la zona oeste y centro de Buenos Aires y Santa Fe, sur de Córdoba y oeste de Entre Ríos (De Bernardi, 2016).

Uno de los atributos más importantes de las legumbres, es su capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno, constituyendo una importante fuente de este elemento en los ecosistemas naturales y agrícolas (Nemecek et al., 2008). Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno perteneciente a la familia de las *Rhizobiaceae* que han sido ampliamente utilizadas para la elaboración de inoculantes biológicos para cultivos de leguminosas como la arveja y la soja, constituyéndose en una alternativa viable para mejorar la nutrición y el rendimiento de los cultivos mediante una fijación biológica más eficiente del N₂, con niveles que oscilan entre el 60 y 90 % de fijación biológica de nitrógeno (FBN) para ser utilizado por las plantas, favoreciendo el desarrollo de una agricultura ecológicamente sostenible y reduciendo costos de producción (Alfonso et al., 2005). También acumulan metabolitos secundarios tales como isoflavonoides, que son considerados beneficiosos para la salud humana debido a sus propiedades anticancerígenas y antioxidantes entre otras (Dixon y Sumner, 2003).

Las semillas de arveja son ricas en proteína (23-25 %), almidón de digestión lenta (50 %), azúcares solubles (5 %), fibra, minerales y vitaminas (Dahl et al., 2012). En todo el mundo, las legumbres contribuyen con cerca de un tercio del consumo directo de proteínas por la humanidad, siendo también una importante fuente de forraje, combustible y aceites industriales. Además, en el último tiempo se están desarrollando exitosamente comidas a base de proteína vegetal, en reemplazo de las comidas a base de proteína animal, lo que está aumentando enormemente su demanda y sus expectativas futuras. La arveja y sus productos derivados son utilizadas en una gran variedad de preparaciones debido a su valor nutritivo, su bajo costo, su versatilidad para ser cocinadas y las propiedades funcionales de sus componentes. De esta manera, pueden comercializarse arvejas secas y congeladas, arvejas enlatadas, harina de arveja, snacks, sopas, concentrados y aislados proteicos, almidón nativo y modificado (Maskus, 2010; Annor et al., 2014).

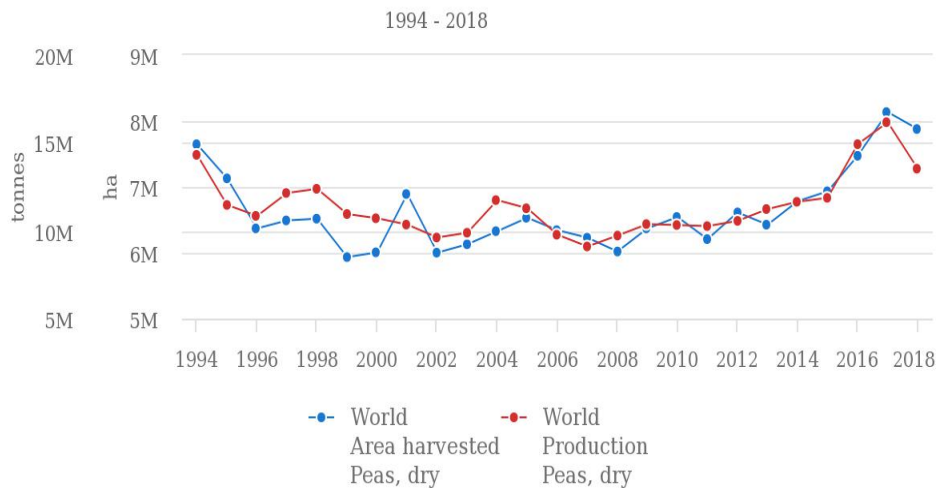


Gráfico 1: Producción mundial (toneladas) y área sembrada (hectáreas) de arveja seca. Fuente: FAOSTAT, 2020.

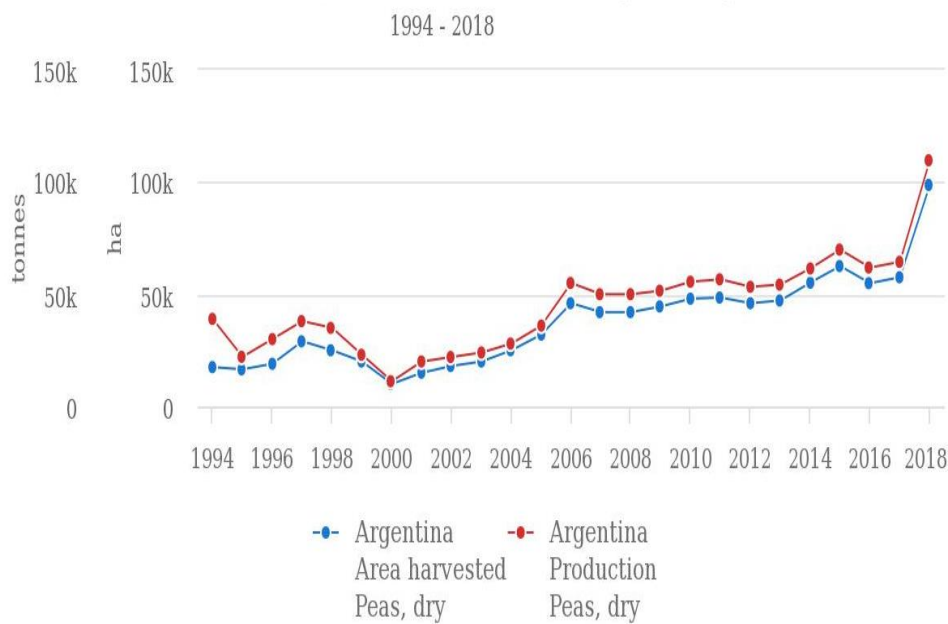


Gráfico 2: Producción Argentina (toneladas) y área sembrada (hectáreas) de arveja seca. Fuente: FAOSTAT, 2020.

4.5 Mejoramiento genético de arveja

Un desafío importante para los mejoradores del cultivo de arveja es el incremento del potencial de rendimiento y la estabilidad de la producción. La arveja seca tiene altos rendimientos que potencialmente podrían alcanzar las ocho toneladas por hectárea (Cousin, 1997). Sin embargo, el rendimiento promedio mundial de arveja seca se ha mantenido relativamente sin cambios en los últimos 25 años, variando estacionalmente entre 1.5 y 2.0 toneladas por

hectárea (FAOSTAT, 2020). Muchos factores bióticos y abióticos limitan su producción considerándose a las enfermedades como la causa más importante de la reducción de la producción de biomasa y el rendimiento de semillas. Según Ali et al., (1994), las tensiones abióticas causadas por condiciones ambientales adversas como el calor, la sequía y las heladas también son responsables de las grandes pérdidas de producción.

El desarrollo de germoplasma mejorado ha sido lento debido al bajo nivel de resistencia / tolerancia que se encuentra en las colecciones de germoplasma disponibles, a la baja confiabilidad de los métodos de detección y a la naturaleza poligénica de la herencia de los caracteres de interés agronómico (Wroth, 1998).

En Argentina, la falta de variedades nacionales ha provocado que sólo se utilicen pocas variedades comerciales que han sido importadas de otras regiones productoras lo que trae aparejada una escasa variabilidad genética para hacer frente a la presión ejercida por los factores bióticos y abióticos que atentan contra los rendimientos logrados. Además, la falta de regulación en la utilización de semilla fiscalizada, trae aparejado que gran cantidad de productores utilicen semilla propia por varios años las cuales terminan convirtiéndose en poblaciones con una gran segregación. Esto desalienta la inversión por parte de las empresas dedicadas al mejoramiento de especies autógamas como la arveja.

El fitomejoramiento es un proceso lento. El desarrollo de nuevas variedades de cultivos como la arveja, a menudo requiere una década o más, utilizando metodologías tradicionales. El progreso es muy lento porque el proceso implica cruzar líneas parentales élite, seguido de 4-6 generaciones de autofecundación para fijar las líneas y poder realizar la evaluación de rasgos agro-morfológicos y rendimiento. Es una operación logística a gran escala que involucra de miles a cientos de miles de plantas en la etapa inicial de fijación de la línea, reduciéndose en gran medida al final del proceso (Lenaerts et al., 2019).

La tasa de ganancia genética en un programa de mejora se puede representar mediante la ecuación del obtentor, un modelo del cambio esperado en un carácter en respuesta a la selección (Falconer y Mackay 1996; Lynch, 1998). La ecuación se puede escribir como $R=$

$\frac{\delta g * i * r}{L}$, donde R es el cambio en la media del rasgo por año, δg es la cantidad de variación genética dentro de la población, i es la intensidad de la selección, r es la precisión de la selección y L es la duración del ciclo de reproducción. En la ecuación del obtentor, el tiempo de ciclo es el más fácil de entender, el más barato de manipular y el parámetro más poderoso para aumentar la ganancia genética (Cobb et al., 2019).

En los programas convencionales de mejoramiento de autógamias como la arveja, existen dos procesos claves:

- Generación y/u obtención de variabilidad genética.
- El método o esquema de selección aplicado sobre las poblaciones segregantes.

4.6 Variabilidad genética en mejoramiento convencional

Las estrategias de mejoramiento generalmente implican la hibridación entre cultivares, o entre cultivares y variedades locales o formas primitivas (McPhee, 2003; Redden et al., 2005; Goulet et al., 2017) debido a que la generación de la variabilidad genética es un prerrequisito esencial de los programas de mejora (Tiwari et al., 2012) ya que, si ésta es escasa limitará los avances del mismo. Su estimación proporcionará la base para un programa de selección efectivo.

Una forma de cuantificar la variabilidad generada, es mediante el uso de los rangos de variación fenotípica que dependen de la complejidad genética de los caracteres evaluados (Huang y Han, 2014). Cuanto mayor sea la variación hereditaria, mayor será la posibilidad de fijar el carácter mediante métodos adecuados de selección (Sharma et al., 2003). Como la mayoría de los caracteres de importancia económica son de herencia cuantitativa, la estimación de la heredabilidad de dichos caracteres nos otorga una medida de la variabilidad presente en las poblaciones. Este parámetro actúa como herramienta predictiva para expresar la confiabilidad de los rasgos fenotípicos y, por lo tanto, una alta heredabilidad podría ayudar en la selección efectiva de caracteres particulares y diseñar futuros programas de reproducción (Mallu et al., 2015).

Mantener y comprender la variabilidad genética presente dentro de una especie cultivada, puede generar información valiosa para los programas de mejoramiento y es importante para la protección de variedades vegetales. Por otra parte, el conocimiento de dicha variabilidad maximiza el uso del germoplasma en los programas de mejoramiento al permitir una más fácil selección de potenciales progenitores de cruas.

El éxito del mejoramiento descansa entonces, en gran medida en el conocimiento y el uso correcto del germoplasma disponible identificando las variedades a usar como progenitores de manera tal que, al ser cruzados, generen una progenie F_1 con un elevado efecto heterótico y favorezcan la aparición de variantes transgresivas que puedan ser seleccionadas en las generaciones segregantes. Este tipo de segregaciones son sumamente importante en el mejoramiento de especies autógamas ya que está conectado con la posibilidad de obtención de variedades superiores. De acuerdo a Rieseberg et al., (1999) la segregación transgresiva consiste en la producción de progenies híbridas F_2 o de generaciones posteriores con fenotipos que exceden el rango de las poblaciones parentales de las que derivan, además, demuestra como la hibridación puede producir nuevos fenotipos.

La variabilidad genética puede ser también evaluada usando marcadores genéticos (Bahrman et al., 1999; Smykal et al., 2008).

Un marcador genético es una diferencia (polimorfismo) heredable de forma mendeliana simple, cuya variabilidad puede ser detectada y estudiada. Son de gran utilidad en análisis de diversidad genética, estudios sistemáticos y evolutivos, identificación de genotipos, etc.

Existen tres categorías de marcadores genéticos: 1) morfológicos (también llamados clásicos o visibles) los cuales son en sí mismos características fenotípicas; 2) bioquímicos, los cuales incluyen a las isoenzimas y proteínas de reserva; y 3) marcadores de ADN (o moleculares), que son sitios de variación del ADN (Winter y Kahl, 1995; Jones et al., 1997).

4.6.1 Marcadores Morfológicos

Los marcadores morfológicos son características fenotípicas de fácil identificación visual, tales como forma, tamaño, color de cotiledón y de flores o tipo de hoja. La caracterización e

identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. Es una metodología de bajo costo y sencilla; la cual ha sido ampliamente utilizada en el cultivo de arveja y la más utilizada por la mayoría de los programas de mejoramiento convencional (Espósito et al., 2007; Smýkal et al., 2008; Dumont et al., 2009; Espósito et al., 2009; Mishra et al., 2009; Sarikamiş et al., 2010; Gatti et al., 2011).

4.6.2 Marcadores Bioquímicos

Los principales marcadores bioquímicos son los enzimáticos, basados en el hecho de que dos variantes de una misma enzima (isoenzimas) pueden presentar diferencias de carga y por lo tanto pueden ser separadas por electroforesis en geles de almidón. El contenido de proteínas de reserva del endosperma también puede ser empleado como marcador bioquímico, y se evalúa a través de la técnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Estos marcadores han sido utilizados en arveja en distintos tipos de estudio (Baranger et al., 2004; Smýkal et al., 2008; Dumont et al., 2009; McPhee et al., 2012; Haider et al., 2013; Guindon et al., 2020).

Las principales desventajas de los marcadores bioquímicos, están determinadas por su cantidad limitada y por la influencia tanto por parte del ambiente como de la fase de desarrollo de la planta (Winter y Kahl, 1995).

4.6.3 Marcadores de ADN

El continuo avance de la biología molecular permitió la generación de distintos marcadores moleculares. Un marcador molecular se basa en la presencia de variaciones de la secuencia del ADN. Entre sus características, se menciona, 1) no están influenciados por el ambiente, 2) presentan un alto nivel de polimorfismo y no tienen efectos pleiotrópicos ni epistáticos, 3) muestran, en algunos casos, una expresión de tipo codominante, 4) comprenden cualquier parte del genoma, sea codificante o no codificante, 5) pueden ser utilizados en estadios tempranos del desarrollo, 6) la mayor parte de los polimorfismos moleculares son neutros, por lo tanto una variación alélica en un locus marcador generalmente no tiene efectos a nivel

fenotípico (Collard et al., 2005). 7) requieren una mayor inversión de equipamiento, como así también su costo es mayor a los demás marcadores.

Esto determina que los marcadores más utilizados sean los marcadores morfológicos a pesar de ser más dificultosa la toma de datos.

4.7 Método de conducción y selección en poblaciones segregantes

Con relación a los esquemas de conducción, los más utilizados por los diferentes programas de mejoramiento son, el Método de Conducción Masal, el Método de *Pedigree* y el Método *Single Seed Descent* (SSD), sin embargo, el más utilizados por su practicidad y por su capacidad de acelerar el avance de generaciones es el método SSD, que consiste en seleccionar aleatoriamente una semilla por planta de una población F_2 proveniente de un cruzamiento y avanzando del mismo modo a través de las generaciones segregantes, permitiendo así la fijación de genes en líneas mejoradas (Goulden, 1941).

La metodología inicial del SSD generalmente utilizaba una generación por año (Brim, 1966) pero los programas de mejora convencionales requieren muchas generaciones de endocria y selección (según el esquema adoptado) para fijar las características de interés, y esto supone una gran inversión de tiempo, espacio y recursos. Esto hace que la eficiencia de los métodos sea en general baja. Es por eso que deben desarrollarse alternativas para mejorar dicha eficiencia.

En la actualidad, se intenta acelerar dicho proceso ya que es un factor limitante en la obtención de nuevas variedades y en el desarrollo de líneas endogámicas recombinantes (Rils) que pueden utilizarse para diferentes análisis genéticos.

4.8 Alternativas para mejorar la eficiencia de los programas de mejora de arveja

Basado en la teoría de la selección fundamental en el fitomejoramiento, acortar el tiempo requerido para el desarrollo de líneas (por ejemplo, el desarrollo de nuevas líneas mejoradas), independientemente del método utilizado, aumenta la tasa de ganancia genética. Es importante destacar que, la reproducción más rápida y los ciclos de reproducción más cortos

pueden ser una de las formas más simples y efectivas de desarrollar nuevas variedades, que se adapten a los climas actuales para minimizar los efectos del cambio climático (Atlin et al., 2017).

La comunidad científica y las empresas vinculadas al mejoramiento, desarrollan continuamente alternativas que permitan una mayor eficiencia y ganancia genética en los programas de mejoramiento.

Diferentes alternativas han sido propuestas para la reducción de los tiempos necesarios para la obtención de nuevos materiales genéticos.

El concepto de "*shuttle-breeding*" fue desarrollado originalmente por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) para el programa de mejoramiento de trigo, y fue popularizado por el premio Nobel Dr. Norman Borlaug. Básicamente, este sistema permitió avanzar una generación adicional cada año mediante el uso de una ubicación de campo diferente.

Por otra parte, Brummer et al., (2011) y Atlin et al., (2017) postulan la siembra en contra-estación. Sin embargo, en un cultivo como arveja, Ochatt y Sangwan (2010) mostraron que sólo pueden realizarse dos generaciones por año mediante el cambio de hemisferio o a los sumo tres con el uso de invernáculos, aunque esto implica un costo extra al programa de mejora. El uso de contra-estación en el mismo hemisferio es decir la siembra en primavera-verano tampoco es una alternativa confiable. Esto se debe a la importante pérdida de material segregante provocado por el efecto de las altas temperaturas, ya que la etapa posterior a floración, cuando se fija el número de granos, es muy sensible a las altas temperaturas, lo que provoca aborto de flores, de vainas y de granos (Sita et al., 2017). Esto no es ideal ya que la alta tasa de pérdida de material reduciría significativamente la varianza genética.

La tecnología doble haploide (DH) es otra técnica desarrollada para mejorar la ganancia genética en los programas de mejoramiento. Los haploides inducidos por el cultivo *in vitro* de células gametofíticas, particularmente gametofitos masculinos, son de gran importancia en los programas de mejoramiento de cultivos (Pratap et al., 2018). El mejoramiento por DH permite

a los criadores desarrollar genotipos completamente homocigotos a partir de progenitores heterocigóticos en una sola generación y permite fijar los gametos recombinantes directamente como líneas homocigotas fértiles (Forster et al., 2007; Pratap et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de las especies de legumbres son recalcitrantes a esta tecnología (Croser et al., 2006; Germana et al., 2011; Gatti et al., 2016; Bermejo et al., 2020), por lo tanto, su implementación no es factible, además de ser una tecnología costosa por el equipamiento requerido sumado a la reducción de las posibilidades de recombinación de los materiales (Liu et al., 2016). Algunos investigadores argumentan que los beneficios teóricos no son suficientes para implementar la tecnología DH en todos los programas de mejoramiento. De hecho, se debe considerar la rentabilidad, la fijación de alelos raros y útiles, la conservación de la variabilidad genética en las líneas de selección, la uniformidad y estabilidad de las nuevas variedades liberadas (Thomas et al., 2003; Germana, 2006). La principal dificultad para mejorar la androgénesis radica en la amplia gama de factores que influyen en el proceso (Wędzony et al., 2009).

Otra alternativa a considerar consiste en la utilización del cultivo *in vitro*. Dicha alternativa se ha utilizado tanto como para la inducción precoz de la floración, con el objetivo de acortar dicho periodo, como así también para acortar los tiempos requeridos en la formación de semillas mediante la siembra de embriones inmaduros. La temperatura y el fotoperiodo son factores claves en la transición a la floración en leguminosas (Nelson et al., 2010), por lo tanto, la variación de estos factores, sumado a la metodología del cultivo *in vitro* y el rescate de embriones reducirían los tiempos necesarios para la aceleración de generaciones. Sin embargo, las especies pertenecientes a la familia Fabácea en general son recalcitrantes para su regeneración *in vitro*. En arveja, diversos autores (Ochatt et al., 2002; Surma et al., 2013) la han aplicado a fin de inducir la floración *in vitro* utilizando fotoperiodos inductivos y en algunos casos la aplicación de reguladores vegetales. Ochatt et al., (2002), aceleraron el mejoramiento mediante la inducción de la floración y el cuajado de semillas *in vitro* sobre un medio de cultivo libre de hormonas para producir un máximo de seis generaciones por año en

arveja y cuatro en vigna (*Vigna subterranea* L.). Sin embargo, esto pudo ser posible en unas pocas variedades de ciclo corto y con eficiencias muy bajas. Por otra parte, Ribalta et al., (2014) mejoraron este protocolo de floración *in vitro* en una variedad de genotipos utilizando la antigiberelina Flurprimidol (a-(1-metiletil)-a-[4-(trifluorometoxi) fenil]-5-pirimidinmetanol), reduciendo la longitud del entrenudo para controlar crecimiento de la planta. El Flurprimidol se utilizó para producir plantas compactas y más pequeñas que facilitaron el trabajo en la cámara de cría. Esta hormona bloquea las mono-oxigenasas dependientes del citocromo P450, que cataliza la oxidación de ent-kaureno en ácido ent-kaurenoico, por lo tanto, inhibe la biosíntesis del ácido giberélico (Rademacher 2020). Al inhibir el ácido giberélico se reduce el alargamiento de los entrenudos, disminuyendo consecuentemente la altura de las plantas. En lentejas, Sarker et al., (2012) utilizando dos variedades de tipo microsperma indujeron la floración *in vitro* y la formación de vainas directamente a partir de brotes regenerados *in vitro* con dos tipos de explantes embrionales: nudos cotiledonales y embriones decapitados con un cotiledón adherido. La floración *in vitro* se logró a partir del 74% de los brotes regenerados cuando se cultivaron en medio MS complementado con auxinas sintéticas que incluyen ácido indol-3-butírico (IBA), ácido indol-3-acético (IAA) y ácido 1-naftalenoacético (NAA). Otros autores han utilizado el cultivo *in vitro* en diferentes especies para el rescate de embriones con el objetivo de acortar el periodo de floración a madurez. Fratini y Ruiz (2006) en lenteja, rescataron óvulos 18 días después de la polinización utilizando un protocolo diferente (un medio que consiste en sales MS, kinetina, sacarosa y agar). Dağüstü et al. (2010), evaluaron, en girasol, el rescate de embriones a los 10 días pos antesis mientras que Gebologlu et al., (2011) en tomate, analizaron el rescate de embriones en diferentes estadios utilizando diferentes medios de cultivos. Por su parte, Bermejo et al., (2016) en lenteja, compararon el cultivo de embriones en medio MS con el sistema convencional y determinaron que la extracción de embriones 18 días después de la polinización fue el mejor momento para obtener plantas completamente desarrolladas y acortar los ciclos de generación, y Ribalta et al., (2017), en arveja, demostraron que la iniciación floral precoz y la identificación del

momento exacto de madurez fisiológica del embrión, facilitaron la germinación de semillas inmaduras para acortar aún más el ciclo semilla-semilla. La extracción del embrión la realizaron en un rango más estrecho que comprende el período entre la adquisición de la capacidad germinativa 14 días después de la polinización (DDP) y la maduración completa del embrión (24 DDP).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la regeneración de plantas *in vitro* no es 100% eficiente y varía según las especies (Greenway et al., 2012) y suele ser genotipo dependiente (De la Fuente et al., 2013). La morfogénesis en leguminosas es muy lenta y tiene problemas asociados como el desarrollo de plantas albinas y tejidos vítreos y la falta de respuesta en los tejidos desdiferenciados (callos) crean serios desafíos hacia el uso de métodos *in vitro* en la mejora de leguminosas (Pratap et al., 2010). Si bien, una gran cantidad de trabajos se llevaron a cabo con el objetivo de desarrollar métodos de producción de legumbres por cultivo *in vitro*, ninguno de los métodos fue exitoso para la producción rutinaria de plantas (Gatti et al., 2016; Pratap et al., 2018).

Un factor limitante para la incorporación de las técnicas de aceleración de generaciones *in vitro* en los programas de mejoramiento convencionales viene dado por el alto costo de los materiales, de las labores y la necesidad de mano de obra especializada por lo que son demandadas nuevas tecnologías que mejoren la eficiencia y disminuyan los costos (Chahal y Gosal, 2002; De la Fuente et al., 2013; Varshney et al., 2019; Hickey et al., 2019). Esto, sumado a la dificultad de incorporar tecnologías de transgénesis o edición génica debido a cuestiones políticas, sociales y económicas deben dar lugar al desarrollo de nuevas tecnologías que no incluyan organismos genéticamente modificados (OGM) (Eriksoon et al., 2019).

4.8.1 Tecnología de *Speed breeding*

En los últimos años un sistema denominado *Speed breeding* (SB) ha sido desarrollado en diferentes cultivos. Este concepto se inspiró en los esfuerzos de la NASA (*National*

Aeronautics and Space Administration) para cultivar en el espacio, utilizando una cámara cerrada y un fotoperiodo extendido. Al reconocer la oportunidad de producir más rápidamente plantas adultas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) y permitir una selección y un desarrollo de la población más rápidos, se convirtió en la norma en las actividades de investigación de cereales en la Universidad de Queensland (UQ), Australia (Hickey et al., 2019). La técnica utiliza una calidad de luz óptima, intensidad de luz, duración del día y control de temperatura para acelerar la fotosíntesis y la floración, junto con la cosecha temprana de semillas. Lo más destacado del proceso es que puede reducir el tiempo de generación y acortar el ciclo de reproducción, lo que permite el rápido desarrollo de líneas avanzadas estables y mapeo de poblaciones, detección para identificar fuentes de materiales donantes para diferentes rasgos y el desarrollo más rápido de cultivares mejorados (Watson et al., 2018). Esta metodología es adecuada para diversos tipos de germoplasma y no requiere equipo específico. Las plantas cultivadas en condiciones de *Speed breeding* generalmente alcanzan el momento de antesis en aproximadamente la mitad del tiempo en comparación con las cultivadas en un invernadero normal (Watson et al., 2018). Esto puede mejorar la ganancia genética en los programas de mejoramiento aumentando el número de generaciones en un año, acortando así el ciclo de reproducción. Distintos protocolos fueron desarrollados para diferentes especies como maní (*Arachis hypogaea* L.) (O'Connor et al., 2013), arroz (*Oryza sativa* L.) (Collard et al., 2017), soja (*Glycine max* L.) (Nagatoshi et al., 2018), cebada y trigo (Watson et al., 2018).

En legumbres secas se desarrollaron diferentes avances en sistemas de SB. En garbanzo, Samineni et al., (2019), obtuvieron entre 6 y 7 generaciones por año en condiciones de invernadero con luz artificial y sin agregado de reguladores de crecimiento. En arveja, Mobini y Warkentin (2016) lograron hasta cinco generaciones en un año, con un sistema hidropónico acompañado de rescate de embriones utilizando un regulador de crecimiento vegetal (0.6µM flurprimidol). En lenteja (*Lens culinaris* Medik), Lulsdorf y Banniza (2018) desarrollaron un sistema con un fotoperíodo de 20 horas combinado con la germinación de semillas inmaduras.

Y en guandu (*Cajanus cajan* L.), Saxena et al., (2019) utilizaron una instalación de invernadero con luz natural y enfriadores de aire por evaporación que permitieron cuatro generaciones de semilla a semilla en un año.

Así, esta metodología podría usarse para generar rápidamente poblaciones fijas a través del método SSD, que en algunas especies puede ser más económico que generar DH, para la posterior evaluación y selección de campo, facilitando así la ganancia genética y la producción de cultivares mejorados.

5. HIPÓTESIS

- La utilización de métodos SSD modificados junto con la aplicación de la antigiberelina *Flurprimidol*, permite acelerar la obtención de Rils acortando ciclos generacionales.
- La variabilidad genética en una población F_2 se mantiene independientemente del método SSD modificado utilizado para la obtención de líneas recombinantes de arveja.
- La aparición de individuos transgresivos en las generaciones segregantes serán útiles para el programa de mejora.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Implementar técnicas no convencionales asociadas al método SSD (*Single Seed Descend*) que permitan hacer más eficiente los programas de mejora a fin de incorporar al mercado nuevas variedades de arveja adaptadas a las condiciones de la región que al incrementar la estabilidad disminuyan los riesgos productivos mejorando la sustentabilidad de la producción.

6.2 Objetivos específicos

- Estimar la variabilidad genética presente en la generación F_2 y $F_{2,3}$ para caracteres morfológicos.
- Determinar y comparar la eficiencia entre los diferentes métodos de mejora SSD (convencional y modificados) relativo a la aceleración de generaciones.
- Estimar la variabilidad genética entre las Rils (*Recombinant Inbred Lines*) derivadas del método convencional y del no convencional seleccionado a través de caracteres morfológicos.
- Comparar la variabilidad genética obtenida al final del proceso con aquella observada en la población de partida.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Caracterización de las variedades utilizadas como parentales y del efecto ambiental en los diferentes años de evaluación.

7.1.1 Material vegetal

Los materiales que dieron lugar a las poblaciones que se utilizaron para evaluar los diferentes métodos SSD tanto convencional como modificado, pertenecen a la colección activa de nuestro grupo de trabajo. Una de las poblaciones F_2 , provino de la hibridación entre las variedades Ilca 5115 x Turf con color de cotiledón verde, mientras que la restante, con color de cotiledón amarillo, provino de la hibridación entre las variedades Zavalla 15 x Amarilla. Los parentales fueron seleccionados tanto por discrepar en sus características morfo-agronómicas como por su origen, siendo las variedades Turf y Amarilla de tipo semiáfila mientras que Ilca 5115 y Zavalla 15 presentan folíolos normales. Las generaciones F_1 fueron obtenidas mediante castración y polinización manual seguida por una generación de autofecundación para el logro de poblaciones F_2 .

Las variedades utilizadas como parentales para la obtención de las poblaciones segregantes fueron sembradas durante los años 2017, 2018 y 2020, junto a las poblaciones F_2 , $F_{2:3}$ y las Rils respectivamente y sus características se resumen en la Tabla 1.

Variedades	ILCA	TURF	ZAVALLA	
	5115		15	AMARILLA
Color de cotiledón	Verde	Verde	Amarillo	Amarillo
Origen	España	Rusia	Argentina	Siria
Estructura de la planta	Foliosa	Semi-áfila	Foliosa	Semi-áfila
Altura	Alta	Baja	Alta	Baja
Rendimiento	Bajo	Medio – Alto	Alto	Medio

Tabla 1: Características de las variedades utilizadas como parentales para generar las poblaciones segregantes



Figura 3: imágenes de los diferentes tipos de variedades a) Variedades de arveja de tipo foliosa. b) Variedades de arveja de tipo semi-értila.

7.1.2 Análisis Fenotípico

Tanto en las variedades utilizadas como parentales, como en las generaciones F_2 , en las familias $F_{2,3}$ y en las Rils se evaluaron características morfológicas de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2009). En las poblaciones F_2 las evaluaciones se realizaron a nivel de planta individual, mientras que para las familias $F_{2,3}$, las Rils y los parentales se determinaron los valores promedios por parcela. Se evaluaron los siguientes caracteres cuantitativos:

- Días a 50 % de floración (DF): período comprendido desde la siembra hasta el 50 % de inicio de floración de la parcela.
- altura de planta al momento de la cosecha (cm) (AP),
- número de vainas por planta (NV/P), número de vainas por parcela (NV),
- número de granos por planta (NG/P), número de granos por parcela (NG),
- longitud de la vaina (cm) (LV),
- número de granos por vainas (NG/V),
- Peso total de granos por planta (gr) (P), Peso total de granos por parcela (gr) (P).

7.1.3 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianzas (ANDEVA) a dos criterios de clasificación, con el objetivo de caracterizar las variedades parentales que dieron lugar tanto a las poblaciones segregantes amarillas como a las poblaciones verdes, y caracterizar los ambientes en los cuales se realizó la siembra de los diferentes materiales, tomando como ambientes diferentes a cada año de evaluación. El análisis de varianza se realizó siguiendo el modelo de efectos fijos. A partir de este, se realizó un test de Tukey (Tukey, 1949), con el objetivo de calcular el promedio general de cada variedad tomando todos los ambientes evaluados y así comparar cada variedad parental con su par, con el cual dieron origen a las poblaciones segregantes. Por otra parte, se realizó un test de Tukey con el objetivo de caracterizar y comparar los diferentes años de evaluación. Para eso, se calcularon los valores promedios de ambos parentales juntos (los que dieron origen a cada población segregante) para cada año de evaluación.

7.2 Análisis de la variabilidad genética presente en las poblaciones F_2 y $F_{2.3}$.

7.2.1 Material vegetal

Para evaluar la variabilidad genética presente en las generaciones tempranas (F_2 y $F_{2.3}$), 150 semillas de cada una de las poblaciones F_2 fueron sembradas durante el mes de junio de 2017, en la Sección de Horticultura, del Campo Experimental J.F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (33°1 LS y 60°53 LO) en surcos de 30 m de longitud, aplicando un marco de plantación de 70 cm entre surcos y 10 cm entre plantas dentro del surco. La cama de siembra se preparó con labranza convencional y las semillas fueron tratadas con curasemillas (fludioxonil (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pirrol-3-carbonitrilo) y metalaxil-M (N-(2,6-dimetilfenil)-N-(2'-metoxiacetil)-D-alanina metil ester). Se utilizó un sistema de riego por goteo y se efectuó un tratamiento con herbicida Linurón (3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea) en pre-siembra e Imazetapir (ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin 2 il) nicotínico) como pre-emergente para evitar la competencia con malezas. Simultáneamente y en un surco apareado, se sembraron en

parcelas de 2 m de largo con dos repeticiones, los genotipos parentales utilizados en el cruzamiento.

De los 150 individuos F_2 en cada población, 96 individuos de la población de arveja amarilla y 92 individuos de la población de arveja verde, generaron suficientes semillas para formar las familias $F_{2,3}$ las cuales fueron sembradas durante el año 2018 en parcelas de 2 m de largo y en un diseño completamente al azar con dos repeticiones de 10 plantas por familia. El marco de plantación fue de 70 cm entre surcos y de 10 cm entre plantas. Simultáneamente se sembraron parcelas de 2 m de largo cada uno con los materiales parentales en dos repeticiones utilizando el mismo marco de plantación. Se aplicaron también herbicidas pre-emergentes para el control de malezas y se colocó riego por goteo a fin de suministrar agua en los períodos necesarios.

7.2.2 Análisis Fenotípico

En las generaciones F_2 y en las familias $F_{2,3}$, se evaluaron características morfológicas de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2009). En las poblaciones F_2 las evaluaciones se realizaron a nivel de planta individual, mientras que para las familias $F_{2,3}$ se determinaron los valores promedios por parcela. Se evaluaron los mismos caracteres cuantitativos que los descritos para los materiales parentales.



Figura 4: Imagen de las parcelas de familias $F_{2,3}$ sembradas a campo para análisis fenotípico (año 2018).

7.2.3 Análisis estadísticos:

Para las poblaciones F_2 se determinaron los valores promedios, el coeficiente de variación (CV) y los valores máximos y mínimos para cada carácter fenotípico como medida de la variabilidad presente.

Se determinó el porcentaje de individuos transgresivos (%T), considerando como tales a aquellos individuos con valores superiores en un 5% el valor del progenitor superior (Sherya et al., 2017). Para los caracteres altura de planta, y días a floración se consideraron como transgresivos aquellos con valores inferiores a los producidos por los genotipos parentales, (siendo el valor límite para altura 57 cm y 88 días para floración en la población verde y 47 cm y 86 días a floración en la población amarilla). Para evaluar la presencia de segregantes transgresivos en esta generación se calculó el índice de transgresividad (Koide et al., 2018) medido como: R/D, siendo R: el rango de variación entre las plantas F_2 para el carácter en cuestión y D: la diferencia entre los valores promedios de los progenitores para el carácter en cuestión.

Los datos de las familias $F_{2.3}$ correspondientes a las diferentes variables fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANDEVA), a un criterio de clasificación utilizando el software Infostat (Balzarini y Di Renzo, 2003) previa determinación de la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk (1965) y posterior prueba de Tukey para la comparación de los valores promedios. Se estimó también el porcentaje de familias $F_{2.3}$ transgresivas, siguiendo el mismo criterio establecido para la generación F_2 , y el porcentaje de familias $F_{2.3}$ que surgieron a partir de plantas F_2 transgresivas.

En las generaciones F_2 , la varianza fenotípica, la varianza genotípica, la varianza del error experimental, el coeficiente de variación genotípica, el coeficiente de variación fenotípica y la heredabilidad en sentido amplio se estimaron de acuerdo con la fórmula propuesta por Mahmud y Kramer (1951).

$$H_2(S.A) = \frac{VF2 - \sqrt{VP1 \times VP2 \times 100}}{VF2}$$

H_2 (S.A) = Heredabilidad en sentido amplio

VF_2 = Varianza fenotípica F_2

VP_1 = Varianza Padre 1

VP_2 = Varianza Padre 2

Los errores estándares de los estimados de heredabilidad se calcularon siguiendo la metodología establecida por Mariotti y Collavino, 2014.

A partir del ANDEVA de las familias $F_{2,3}$ se estimaron los componentes de variancia entre (σ_e^2) y dentro (σ_d^2) de las familias y se calculó la heredabilidad en sentido estricto (h^2) de acuerdo a la fórmula establecida por Cahaner y Hillel (1980)

$$h^2 = \frac{3}{2} \frac{\sigma_e^2}{(\sigma_e^2 + \sigma_d^2)}$$

El error estándar de la heredabilidad se estimó a partir de la variancia del coeficiente de correlación intraclase (Falconer, 1996).

Con el fin de observar la distribución de las familias F_2 y $F_{2,3}$ y además graficar su variabilidad en función de todas las variables en conjunto se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP) a fin de determinar que variables contribuyen en mayor medida a la variación total existente.

7.3 Evaluación de metodologías de aceleración de generaciones

Los experimentos se llevaron a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Santa Fe (33 ° 1 'S y 60 ° 53' W).

Se evaluaron tres metodologías de aceleración en generaciones:

* *In vitro*,

* *In vitro - in vivo*,

* *In vivo*.

En todos los experimentos, se utilizaron variedades pertenecientes a la colección activa del grupo de investigación y se utilizaron como control las mismas variedades sembradas a campo. A partir de estos datos, se seleccionó la metodología que mejor se adaptaba a los

objetivos del trabajo y luego se llevaron a cabo las evaluaciones utilizando las poblaciones F₂ segregantes antes mencionadas.

7.3.1 Método *in vitro*

Se evaluaron cuatro variedades comerciales semi-áfilas (Kaspa, Navarro, Amarilla y Turf). Se sembraron tres explantes diferentes (semilla completa, plántulas con el ápice retirado y solo el ápice). Después de 7 días de la siembra, los embriones germinados se utilizaron como fuente de explantes. Los meristemos apicales de los tallos (de 1 cm de longitud comprendiendo dos entrenudos) se extrajeron de las plantas con un bisturí. Las plantas con el meristemo eliminado y los meristemos apicales de los tallos partidos se utilizaron como explantes. Tanto los explantes como la semilla completa se cultivaron en tubos de cultivo de 30 cm de largo que contenían 20 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con macro y micronutrientes y vitaminas del medio B5 (Gamborg et al., 1968), 3% (m / v) de sacarosa y 0.6% (m / v) de agar-agar. El medio se ajustó a pH 5,6 antes de la adición de agar y se esterilizó en autoclave a 121 ° C durante 20 min. Como inhibidor de la síntesis de giberelina, se utilizó 0,6 µM de flurprimidol (α - (1-metiletil) - α - [4- (trifluorometoxi) fenil] -5-pirimidinometanol) para controlar la altura de la planta y fue incorporado al medio de cultivo. También se utilizó un testigo sin flurprimidol.

Diez explantes por tratamiento y dos repeticiones se realizaron con un diseño completamente al azar. Todos los tubos de cultivo se expusieron a un fotoperiodo de 20 horas de luz suministrada por tubos fluorescentes (T5) ($500 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) y una temperatura de 20 ± 2 °C. La floración se marcó cuando los pétalos excedieron el nivel de los sépalos coincidente con la antesis (Ribalta et al., 2017). Se analizó el número de flores producidas por cada explante y cada concentración de flurprimidol, los días de siembra hasta la floración, los días a ciclo completo y la eficiencia del método (tomada como la cantidad de plantas cosechadas sobre la cantidad de plantas sembradas).

7.3.2 Método *in vitro* - *in vivo*

Como material experimental, se utilizaron 3 variedades comerciales semiáfilas (Kaspa, Amarilla, Turf) y una con tipo de hoja normal (Zavalla 15). Se usó un sistema de cultivo hidropónico simplificado en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 20 horas de luz suministrada por tubos fluorescentes (T5) ($500 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) y una temperatura de 20 ± 2 °C. Las semillas de cada variedad se sembraron en bandejas de germinación (30 ranuras cada una y 3 semilla por ranura) con perlita como sustrato. Luego de la germinación, se ralearon con el objetivo de dejar una plántula por cada ranura. La solución hidropónica con 6 macronutrientes y 11 micronutrientes, (solución verde y roja, Verde al Cubo, Buenos Aires, Argentina) se aplicó 1 o 2 veces por semana dependiendo del desarrollo de las plantas. Se utilizó un diseño completo aleatorizado con dos repeticiones. Se aplicó una solución de $0,6 \mu\text{M}$ de flurprimidol como inhibidor de la síntesis de giberelinas en la solución hidropónica cuando las plántulas tenían 3 hojas verdaderas. Se evaluaron los días hasta la floración y el ciclo completo y se marcaron las flores en el momento de la antesis. Para determinar el efecto de la metodología junto a la antigiberelina flurprimidol se evaluó la altura de las plantas al momento de la cosecha. La eficiencia del método fue evaluada teniendo en cuenta el porcentaje de plantas con vainas en relación a la cantidad de plantas sembradas. Las vainas obtenidas se cosecharon 18 días después de la floración, se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 70% (v / v) durante 5 segundos, 10 minutos en hipoclorito de sodio al 3,5% (v / v) y se enjuagaron 4 veces en agua destilada estéril. En condiciones asépticas, las semillas inmaduras se extrajeron de las vainas, los tegumentos seminales se eliminaron y se cultivaron en dos medios de germinación, medio MS (descrito previamente en el ensayo *in vitro*) y en perlita. Se utilizaron 30 embriones por variedad y sustrato, en un diseño aleatorio completo con dos repeticiones. Se evaluó el porcentaje de embriones germinados por sustrato y variedad.

Para comparar esta metodología, como control se sembraron las mismas variedades a campo, en parcelas con cuatro hileras de 2 m de largo con 70 cm entre hileras y 10 cm entre plantas dispuestas en un diseño aleatorio completo con dos repeticiones. El suelo se preparó

con labranza convencional y las semillas se trataron con cura de semillas (fludioxonil (4- (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il) -1H-pirrol-3-carbonitrilo) y metalaxil-M (N- (2,6-dimetilfenil) -N-(2'-metoxiacetil) -D-alanina metil éster). Un sistema de riego por goteo y herbicida Linuron (3-(3,4-diclorofenil) -1-metoxi-1 -metilurea) en la pre-siembra y Imazetapir (5-etil-2- (4-isopropil-4-metil-5-oxo. -2-imidazolin 2 il) nicotínico) como pos-emergente. Se analizaron las mismas variables que las mencionadas anteriormente, altura de la planta antes de la cosecha, los días a floración, los días a cosecha y la cantidad de plantas cosechadas en relación a la cantidad de plantas sembradas. Y a partir de estos datos se comparó la eficiencia del método.



Figura 5: Imagen de plantas de arveja en sistema hidropónico utilizado en los métodos *in vitro* – *in vivo* e *in vivo*.

7.3.3 Método *in vivo*

Se sembraron dos variedades semi-áfilas (Turf y Amarilla) y dos variedades de hojas normales (Ilca 5115 y Zavalla 15) en el mismo sistema hidropónico descrito en el método anterior. Se utilizaron 30 individuos por variedad, en un diseño completamente al azar con dos repeticiones. Las vainas se cosecharon 24 días después de la floración cuando los granos alcanzaron la madurez fisiológica (Ribalta et al., 2017). Se almacenaron en bandejas y una vez cosechadas todas las vainas se sembraron para comenzar la próxima generación. Se registró la altura de la planta antes de la cosecha, los días a floración, los días a cosecha y se calculó la eficiencia del método, medida como el número de plantas cosechadas sobre el número total de plantas sembradas.

Al igual que el método anterior, como control se sembraron las mismas variedades en el campo utilizando el marco de plantación descrito anteriormente y analizando las mismas

variables que las analizadas para la actual metodología. A partir de estos datos se analizaron la eficiencia y se comparó al método con su control.

7.3.4 Selección del método

El método se seleccionó, en función de diferentes variables es decir los días necesarios para completar el ciclo, la eficiencia en la conservación de los materiales evaluados y la factibilidad de incorporarlo a un programa de mejoramiento en función de los costos necesarios para llevarlo a cabo.

7.3.5 Poblaciones segregantes

A partir de la selección del método más eficiente, se llevó adelante la evaluación del mismo sobre las poblaciones segregantes. Se sembraron 90 individuos de una población F_2 proveniente de la hibridación de variedades con cotiledón verde (Turf x Ilca 5115) y 90 de un F_2 derivado de la hibridación de variedades con cotiledón amarillo (Zavalla 15 x Amarilla). Cada población F_2 se generó a partir del cruce entre las variedades de hojas semi-áfílas y normales, por lo tanto, la población F_2 presentó, en promedio, un 75% de las plantas con hojas normales. Se realizaron y evaluaron durante dos ciclos de recombinación en un diseño completamente al azar. Las mismas poblaciones también fueron sembradas a campo, las cuales sirvieron como control y permitieron realizar los análisis y las comparaciones.

7.3.6 Análisis estadísticos para la evaluación de los diferentes métodos

La distribución normal de los datos morfológicos evaluados en los diferentes métodos se verificó mediante una prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Se calcularon los valores promedios para cada variable. Los datos de altura y de duración del ciclo de las variedades y de las poblaciones segregantes se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el software estadístico Infostat (Balzarini y Di Renzo, 2008) con el objetivo de determinar diferencias significativas entre los métodos SSD *in vitro-in vivo* y SSD *in vivo* y también para ambos métodos y su respectivo control.

7.4 Análisis de la variabilidad de las Rils obtenidas por el método SSD convencional y el SSD modificado superior.

7.4.1 Siembra de las Rils

Durante el año 2020 se realizó la siembra de las Rils obtenidas tanto por el método SSD convencional como por el método seleccionado como superior para el avance generacional. La siembra se efectuó, en parcelas de 2 m de largo y en un diseño completamente al azar con dos repeticiones de 10 plantas por familia. El marco de plantación fue de 70 cm entre surcos y de 10 cm entre plantas. Simultáneamente se sembraron parcelas de cada uno de los materiales parentales en dos repeticiones utilizando el mismo marco de plantación. Se aplicaron también herbicidas pre-emergentes para el control de malezas y se colocó riego por goteo a fin de suministrar agua en los períodos necesarios, utilizando los mismos productos y siguiendo las mismas prácticas de manejo que se indicaron en las familias $F_{2.3}$.

Para el análisis fenotípico se evaluaron las mismas características morfológicas que las ya mencionadas para los materiales parentales y las familias $F_{2.3}$ de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2009)

7.4.2 Análisis estadístico de las Rils

Para los grupos de Rils se determinaron los valores promedios para cada variable, el coeficiente de variación (CV) y los valores máximos y mínimos para cada variable como medida de la variabilidad presente. Estos datos fueron comparados con sus respectivas poblaciones F_2 y $F_{2.3}$ con el objetivo de determinar la eficiencia de cada método en la conservación de la variabilidad. Y además entre las Rils provenientes del método SSD convencional con el no convencional seleccionado para determinar diferencias en la eficiencia de ambos con respecto a la conservación de la variabilidad. También se realizaron análisis de la varianza (ANDEVA) para cada población de Rils, para determinar diferencias significativas entre las familias y calcular a partir del mismo los valores de heredabilidad en sentido estricto

para poblaciones evaluadas en un ambiente. La heredabilidad se calculó a partir de la siguiente formula:

$$\delta^2g = (CM_{\text{entre familias}} - CM_{\text{error}}) / N^{\circ} \text{ de Repeticiones.}$$

$$h^2: \delta^2g / (\delta^2g + CM_{\text{error}})$$

Con el fin de caracterizar mejor la distribución de la variabilidad de las Rils obtenidas por ambos métodos y hacer un análisis más detallado de dicha variabilidad, se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para las poblaciones de arveja verde y otro para las amarillas, en función de todas las variables en conjunto, a la cual se le sumaron los datos de las familias $F_{2,3}$ correspondiente. Este análisis permitirá representar todas las variables en conjunto, graficar en qué medida cada variable influyo sobre la distribución de las familias y analizar la distribución de la variabilidad las poblaciones. Posteriormente se realizó un diagrama de perfil multivariado, que permite un análisis más riguroso de la distribución de la variabilidad ya que representa la variabilidad presente en cada población en función de cada variable analizada, lo que nos permitió realizar un mejor análisis sobre las causas de la variabilidad en cada población y nos permitió comparar la eficiencia con respecto a la conservación de la misma.

Por otra parte, también se determinó la presencia de segregantes transgresivos entre las Rils, considerando como tales a aquellas con valores superiores en un 5% el valor del progenitor superior (Sherya et al., 2017). Estos valores se tomaron para los caracteres productivos (NV, NG, NG/V y P), con respecto al valor de los parentales sembrados el mismo año (2020). Mientras que, en los caracteres altura de planta, se tomaron valores entre 60 y 80 cm y para días a floración, valores menores a 90 días, ya que son las características deseables para las variedades comerciales. Se calculó el porcentaje de Rils transgresivas sobre el total de cada población de Rils.

Utilizando el software estadístico Infostat (Balzarini y Di Renzo, 2008), también se realizó un análisis de conglomerados utilizando los diferentes caracteres para las diferentes poblaciones de Rils, con el objetivo de seleccionar grupos con características superiores.

Como análisis adicional y con el fin de conocer las asociaciones entre las variables se realizó un análisis de correlación en todas las generaciones evaluadas utilizando también el software InfoStat.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización de las variedades utilizadas como parentales y del efecto ambiental en los diferentes años de evaluación.

La mayoría de los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,90$, excepto LV y NG/V para ambas poblaciones. A pesar de esta falta de normalidad de estas dos variables, su análisis se realizó de igual forma, debido a la naturaleza fisiológica de estos caracteres que están muy acotados en su variación y al hecho de que no es fundamental el desarrollo de normalidad siempre y cuando la muestra sea suficientemente grande (>20) (Minitab, 2022). El ANDEVA demostró que para ambas variedades de arveja amarilla (Zavalla 15 y Amarilla) hubo diferencias significativas en AP, NV, NG, DF y P, mientras que dentro de los diferentes ambientes evaluados las diferencias fueron significativas en AP, NV, NG, NG/V, LV DF y P, es decir todos los caracteres evaluados. Por otra parte, para interacción genotipo-ambiente (IGA) las diferencias fueron altamente significativas. En el ANDEVA realizado sobre los datos de los parentales de arveja verde (Ilca 5115 y Turf), (Tabla 3), existen diferencias significativas para AP, N, NG, LV, DF y P, mientras que dentro de los tres ambientes evaluados para dichos parentales (2017, 2018 y 2020) hubo diferencias significativas en al menos un ambiente para todos los caracteres excepto NG/V. Con respecto a la IGA hubo diferencias significativas excepto para NV, NG, NG/V y P.

	AP			NV		NG		NG/V	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Variedades	1	8008,3	1601,2*	3640,1	17,8*	34776,3	24,0*	0,1	1,9 ^{ns}
Ambiente	2	503,6	100,7*	11790,2	57,7*	61944,2	42,7*	0,5	11,6*
IGA	2	310,1	62,0*	569,1	2,8*	5993,1	4,13*	0,21	4,91*
Error	6	5,0		204,2		1450,8		0,04	

	LV			DF		P	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Variedades	1	0,02	2,3 ^{ns}	120,3	60,7*	3002,0	60,9*
Ambiente	2	0,8	87,6*	102,2	51,1*	3024,1	61,35*
IGA	2	0,1	9,1*	4,1	2,04*	444,2	9,01*
Error	6	0,01		2		49,3	

Tabla 2: Análisis de varianza para los parentales de arveja amarilla. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NG); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

	AP			NV		NG		NG/V	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Variedades	1	4485,3	52,1*	280,3	21,3*	5208,3	9,0*	0,31	2,4 ^{ns}
Ambiente	2	824,2	9,57*	903,6	68,7*	4427,6	7,6*	0,23	1,73 ^{ns}
IGA	2	215,6	5,01*	5,08	0,32 ^{ns}	203,1	0,3 ^{ns}	0,02	0,15 ^{ns}
Error	6	86,1		13,1		578,4		0,13	

	LV			DF		P	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Variedades	1	0,96	21,91*	33,3	29,09*	139,74	10,87*
Ambiente	2	0,42	9,46*	94,0	82,11*	179,89	14,00*
IGA	2	0,1	2,27*	1,6	1,6*	8,1	0,56 ^{ns}
Error	6	0,04		1,15		12,85	

Tabla 3: análisis de varianza para los parentales de arveja verde. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

En la Tabla 4-a) se muestran los valores promedios de ambos parentales de arveja amarilla. Estos valores fueron obtenidos promediando todas las repeticiones y los años evaluados, con el objetivo de calcular un valor promedio general para cada variedad. Se puede observar que

para los parentales de tipo amarillo las diferencias en los valores promedios son significativas para la mayoría de los caracteres, excepto en NG/V y LV. La variedad Zavalla 15 presenta una altura dos veces mayor que Amarilla y mayores valores en los caracteres productivos (NV, NG y P), como así también los días a floración. También es importante destacar que Zavalla 15 es una variedad de tipo foliosa y Amarilla es una variedad de tipo semi-áfila.

De los valores presentados en la Tabla 4-b) correspondientes a los parentales de tipo verde, la variedad Ilca 5115 (de tipo foliosa) resultó tener una mayor altura y días a floración, cuando se la compara con la variedad Turf, mientras que esta última presentó valores superiores en los caracteres productivos (NV, NG y P). Al igual que los parentales de arveja amarilla, las diferencias entre caracteres fueron significativas excepto en NG/V y LV.

Este análisis nos permite observar la gran variabilidad existente entre los diferentes parentales que dieron lugar a las poblaciones segregantes utilizadas en el presente trabajo.

Caracteres	a)		b)	
	Zavalla 15	Amarilla	Ilca 5115	Turf
AP	100±0.91 ^a	48.33±0.91 ^b	93.83±3.79 ^a	55.17±3.79 ^b
NV	108.67±5.83 ^a	73.83±5.83 ^b	46.83±1.48 ^a	56.50±1.48 ^b
NG	314.83±15.55 ^a	207.17±15.55 ^b	119.83±9.82 ^a	161.50±9.82 ^b
NG/V	3.07±0.09 ^{ns}	2.9±0.09 ^{ns}	2.58±0.15 ^{ns}	2.90±0.15 ^{ns}
LV	5.13±0.04 ^{ns}	5.05±0.04 ^{ns}	4.55±0.09 ^b	5.12±0.09 ^b
DF	94.67±0.58 ^a	88.33±0.58 ^b	92.00±0.44 ^a	88.67±0.44 ^b
P	69.52±2.87 ^a	37.88±2.87 ^b	25.23±1.46 ^a	32.05±1.46 ^b

Tabla 4: Comparación de valores promedios y error estándar de los parentales de arvejas amarillas (a) y de arveja verde (b) para los diferentes caracteres evaluados.

Con el objetivo de caracterizar los ambientes en los que se realizaron los diferentes ensayos a campo se promediaron los valores de ambos parentales, tanto los de arvejas de tipo verde como los de tipo amarillo incluyendo sus repeticiones, con el fin de obtener un valor promedio general para cada año, obtener un índice ambiental y así poder efectuar su comparación

(Tabla 5). Los datos se muestran en la Tabla 5. En la misma se observa que el año 2020 presenta valores menores con respecto a los otros años tanto en la evaluación sobre los parentales de arveja amarilla como de arveja verde. Estas diferencias no solo se vieron en los caracteres productivos (NV, NG y P) sino también en altura de planta y días a floración.

Caracteres	Parentales arveja amarilla			Parentales arveja verde		
	2017	2018	2020	2017	2018	2020
AP	79.75±1.12 ^b	81.5±1.12 ^b	61.25±1.12 ^a	87.75±4.64 ^a	76.50±4.64 ^{ab}	59.25±4.64 ^b
NV	149.0±7.15 ^c	83.5±7.15 ^b	41.25±7.15 ^a	64.75±1.81 ^c	55.00±1.81 ^b	35.25±1.81 ^a
NG	381.2±19.0 ^c	269.0±19.0 ^b	132.7±19.04 ^a	159.75±12.02 ^b	160.00±12.02 ^b	102.25±12.02 ^a
NG/V	2.58±0.1 ^a	3.17±0.1 ^b	3.22±0.1 ^b	2.46±0.18 ^a	2.87±0.18 ^a	2.88±0.18 ^a
LV	5.38±0.05 ^b	5.33±0.05 ^b	4.58±0.05 ^a	5.1±0.1 ^b	4.93±0.1 ^b	4.48±0.1 ^b
DF	93.5±0.71 ^b	95.25±0.71 ^b	85.75±0.71 ^a	93.5±0.54 ^b	92.75±0.54 ^b	84.75±0.54 ^a
P	84.18±3.51 ^c	46.18±3.51 ^b	30.75±3.51 ^a	31.35±1.79 ^b	33.56±1.79 ^b	21.00±1.79 ^a

Tabla 5: Comparación de valores promedios y error estándar de las variedades parentales amarillas y verdes

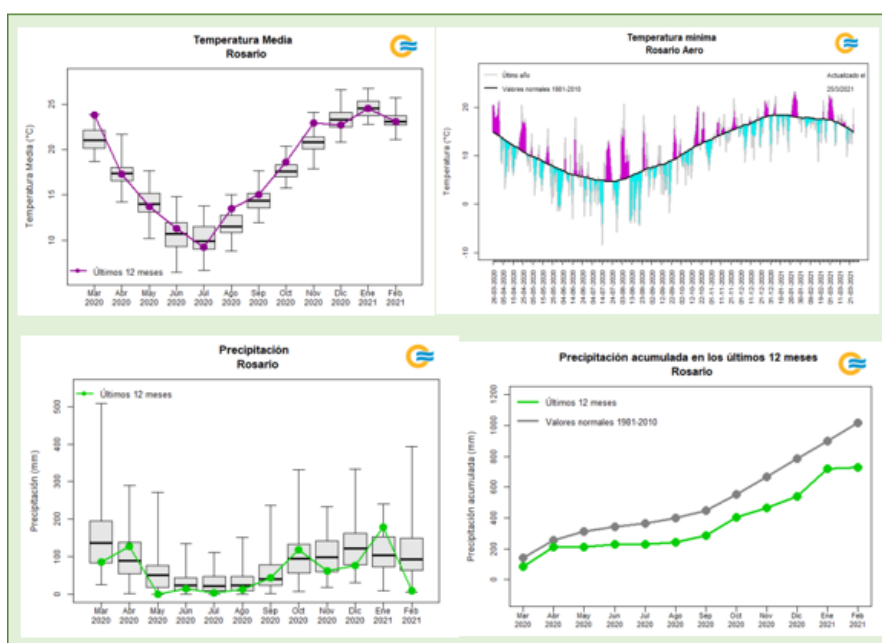


Gráfico 3: gráficos de temperatura media, temperatura mínima, precipitaciones mensuales y precipitaciones acumuladas durante el año 2020. Los datos fueron tomados de la estación meteorológica del aeropuerto internacional de Rosario perteneciente al Servicio Meteorológico Nacional, la cual se encuentra a 20 kilómetros del Campo Experimental.

8.2 Análisis de la variabilidad genética presente en las poblaciones F_2 y $F_{2.3}$.

8.2.1 Análisis de la variabilidad en poblaciones F_2

Las poblaciones F_2 fueron sembradas durante el año 2017. La mayoría de los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,90$, excepto LV y NG/V para ambas poblaciones y como se aclaró con anterioridad fueron analizados de la misma manera que el resto de los caracteres.



Figura 6: Foto de las poblaciones F_2 sembradas en la sección Horticultura durante el año 2017.

Los valores promedios de las poblaciones F_2 , el CV y los valores mínimos y máximos (rangos) se muestran en la Tabla 6. La población F_2 de tipo verde presentó valores promedios superiores para NGP, NV y Df, mientras que en la población F_2 amarilla presentó valores superiores en AP y LV. Al observar los CV nos encontramos que la variación para los caracteres productivos y para la altura de planta generada en la F_2 de tipo verde es superior a la presente en la de tipo amarillo. Según Kosev et al., (2012) los CV se consideran bajos si son inferiores al 10 %, intermedios cuando los valores oscilan entre 10 y 20 % y elevados si resultaron mayores al 20 %. Excepto Df y LV, los CV fueron elevados en ambas poblaciones. Con referencia a los rangos en ambas poblaciones se observó que los mismos fueron de magnitud similar.

	F ₂ Verde			F ₂ Amarilla		
	Promedio	CV	Rango	Promedio	CV	Rango
AP	68.3 ^b	36.0	33 – 121	81.7 ^a	29.8	28 – 122
LV	5.2 ^b	9.5	4 - 6.2	5.53 ^a	8.7	4.3 - 6.7
NV	21.9 ^a	62.8	2 – 72	16.6 ^b	62.1	3 – 58
NGP	58.2 ^a	73.0	4 – 246	43.7 ^b	61.3	15 – 203
NG/V	2.6 ^{ns}	22.9	0.7 - 4.3	2.53 ^{ns}	28.5	1 - 4.8
P	10.6 ^a	86.9	7.5 - 25.4	8.58 ^b	76.8	7.4 - 31.4
Df	95.8 ^a	5.1	86 – 112	94.1 ^b	5.9	85 – 105

Tabla 6: Valores promedios, coeficientes de variación (CV) y Rango de las poblaciones F₂ verde y amarilla para las variables Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV); Número de vaina por planta (NV). Número de granos por planta (NGP). Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P). Días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. Números seguidos de diferentes letras difieren significativamente al 5 % de probabilidad. p<0.05.

Variable	F ₂ Verde				F ₂ Amarilla			
	% T	Dif Padres	Dif F ₂	IT	%T	Dif Padres	Dif F ₂	IT
AP	44.1	54 ^{**}	88	1.63	13.6	60 ^{**}	94	1.57
LV	15.7	0.7 ^{ns}	2.2	3.14	16.8	0.5 [*]	2.4	4.80
NV	51.9	10 ^{**}	71	7.10	20.0	5 ^{**}	55	11.00
NGP	46.1	27 ^{**}	242	8.96	19.2	21 ^{**}	188	8.95
NG/V	21.6	0.18 ^{ns}	3.62	20.1	22.4	0.35 ^{ns}	3.82	10.91
P	30.4	5.36 ^{**}	17.92	3.34	18.4	0.2 ^{**}	24.04	120.2
DF	4.9	3 ^{ns}	26	8.67	3.2	6 ^{**}	20	3.33

Tabla 7: Porcentaje de segregaciones transgresivas (%T) e Índice Transgresividad (IT) en las poblaciones F₂ verde y amarilla para las variables Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV); Número de vaina por planta (NV). Número de granos por planta (NGP). Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de grano por planta (P) y Días a aparición de la primera flor (DF). Dif Padres: diferencia entre valores de los padres. ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. p<0.05. **: Diferencias significativas al 1% de probabilidad. p<0.01.

En relación a la nueva variación producida en la generación F_2 , el índice de Transgresividad (Koide et al., 2018) (Tabla 7) mostró la aparición de segregantes transgresivos para la mayoría de las variables. Además, el porcentaje de segregación transgresiva (%T) varió considerablemente en los diferentes caracteres y poblaciones estudiadas.

De los datos de la Tabla se observa que todos los caracteres presentaron en mayor o menor medida individuos segregantes transgresivos en ambas poblaciones siendo los caracteres AP, NV, NGP y P para la población de cotiledón verde y las variables NV, NGP, NG/V y P para la población de cotiledón amarillo los que presentan mayores valores, sin embargo, los mayores %T no se traducen siempre en un mayor IT.

Para el análisis del IT se establecieron rangos considerándose bajos cuando presenta valores de $0.0 < IT < 5.0$, intermedio $5.0 < IT < 10.0$ y alto $IT > 10.0$. Los valores bajos de IT pueden deberse a la existencia de una gran diferencia entre los progenitores (AP en ambas poblaciones y DF en la población amarilla) o a la generación de una escasa variabilidad en la generación F_2 por lo que los rangos de fluctuación entre las plantas son bajos (LV en ambas poblaciones).

El análisis de correlación en esta generación mostró sólo asociación entre NGP-NV ($r=0.88$; $p<0.01$), NGP-P ($r=0.89$; $p<0.01$), y NV-P ($r=0.84$; $p<0.01$) para la población verde y entre las mismas variables en la población amarilla con valores de NGP-NV ($r=0.79$; $p<0.01$), NGP-P ($r=0.84$; $p<0.01$), y NV-P ($r=0.71$; $p<0.01$) (Tabla 26 y 27). Estas correlaciones eran de esperar al ser todas partes esenciales del rendimiento.

8.2.2 Análisis variabilidad Familias $F_{2,3}$

Las familias $F_{2,3}$ fueron sembradas durante el año 2018. Los datos se tomaron a nivel de parcela y de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2009).



Figura 7: Foto de familias $F_{2.3}$ sembradas en la sección de horticultura. Año 2018.

Al igual que en las poblaciones F_2 todos los caracteres presentaron distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,90$, excepto LV y NG/V para ambas poblaciones siguiendo entonces el mismo criterio aplicado en dicha generación. El análisis de varianza de las familias $F_{2.3}$, mostró la existencia de diferencias significativas al 5% de probabilidad entre las familias para todas las variables tanto en la población de arveja con cotiledón verde como en la población con cotiledón amarillo tal como se observa en las Tabla 8.

$F_{2.3}$ Amarilla	DF	AP		LV		NV		NG	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	95	824.4	10.99*	0.15	1.61*	790.18	3.15*	8879.8	2.06*
Error	96	74.02		0.09		250.79		4312.5	

	DF	NG/V		P		DF	
		CM	F	CM	F	CM	F
Familia	95	0.5	1.45*	299.2	1.94*	24.83	17.59*
Error	96	0.35		154		1.41	

$F_{2.3}$ Verde	DF	AP		LV		NV		NG	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	95	547.63	9.22*	0.17	1.27*	1218.36	3.16*	15254	2.86*
Error	96	59.42		0.14		385.36		5330.9	

	NG/V		P		DF		
	DF	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	95	0.71	1.71*	434.6	3.22*	33.01	13.09*
Error	96	0.42		135		2.52	

Tabla 8: Análisis de la varianza para los diferentes caracteres cuantitativos evaluados en la población F_{2.3} amarilla y la población F_{2.3} verde en el año 2018 para las variables Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV); Número de vainas por planta (NV). Número de granos por planta (NGP). Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y Días a aparición de la primera flor (DF). F: Prueba F de Snedecor. NS: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. p<0.05

En la Tabla 9 se presentan los valores medios, coeficientes de variación (CV) de las familias, el rango, el porcentaje de familias F_{2.3} transgresivas y entre paréntesis el porcentaje de estas familias que provienen de plantas F₂ transgresivas tanto en las poblaciones verdes como amarillas.

	F _{2.3} Verdes				F _{2.3} Amarillas			
	Media	CV	R	%T	Media	CV	R	%T
AP	57.9 ^a	13.3	31-104	51.7(68.7)	74.0 ^b	11.6	36-106	16.5(47.1)
Lv	4.8 ^a	7.3	4.4-5.6	3.3(12.5)	5.3 ^b	5.7	4.5-6	7.2 0.0)
NV	73.9 ^a	26.5	26-142	21.9(24.5)	76.3 ^a	20.7	39-143	7.21(8.0)
NG	229.9 ^a	31.8	70-454	27.5(31.9)	237.2 ^a	27.1	104-403	2.06(4.2)
NG/V	3.1 ^a	20.7	1.7-4.9	41.8(36.4)	3.1 ^a	18.5	1.5-4.5	16.5(25.0)
P	31.4 ^a	37	6-66	24.2(24.8)	35.5 ^b	34.9	12-69	17.4(38.7)
Df	89.7 ^a	1.7	79-96	29.7(40.0)	92.0 ^b	1.2	83-100	6.18(25.0)

Tabla 9: Valores promedios, los coeficientes de variación (CV), rango y %T de las familias F_{2.3} tanto verde como amarilla para las variables altura de planta al momento de cosecha (AP); largo de vaina (LV); número de vaina por parcela (NV); número de grano por parcela (NG); número de grano por vaina (NG/V); Peso total de grano por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). CV: Coeficiente de variación. R: Rango de valores de las familias. Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. p<0.05

En las familias $F_{2,3}$, las familias amarillas presentan valores promedios superiores para la mayoría de las variables y menores CV mientras que los rangos entre las familias $F_{2,3}$ verde y amarillas fueron similares, siendo el límite inferior de NG y de NV mayores en la población amarilla que en las verdes. Analizando los caracteres de la población $F_{2,3}$ verde podemos observar que excepto para el carácter LV, el porcentaje de transgresivos fue mayor o igual a 20%, mientras en la población $F_{2,3}$ Amarilla ningún carácter posee un porcentaje mayor a 20. Como se indica entre paréntesis en la Tabla 9, el porcentaje de familias $F_{2,3}$ transgresivas que provienen de individuos F_2 transgresivos y con valores superiores al 20%, es más elevado en la población verde para todos los caracteres, excepto en LV mientras que en la población de familias amarilla este porcentaje de transgresivos se observó para las variables DF, AP, NG/V y P. En los grafico 4 y 5 se presentan las distribuciones de frecuencias de los caracteres evaluados en la población $F_{2,3}$, junto a los valores de los parentales que dieron origen a dichas poblaciones y en el mismo es posible observar la presencia de familias transgresivas $F_{2,3}$.

Cuando se compara la variabilidad de la generación F_2 , de ambas poblaciones, con su respectiva generación $F_{2,3}$ teniendo en cuenta el CV (Tabla 6 y Tabla 9), se observa que para ambas poblaciones los valores fueron mayores en las poblaciones F_2 , lo que resulta lógico debido a que las evaluaciones en esa población se realizaron a nivel de planta individual mientras que en la generación $F_{2,3}$ la evaluación se realizó a nivel de promedio de parcela con una repetición. Los mismos resultados se obtienen en la comparación de los promedios y los rangos, los cuales se deben a las mismas razones que las explicadas para los CV.

El análisis de correlación mostró la misma asociación que en la generación F_2 con valores de $r=0.81$; $p<0.01$ para NG-NV, $r=0.79$; $p<0.01$ para NG-P, y $r= 0.81$; $p<0.01$ para NV-P en la población verde, mientras que para la población amarilla los mismos fueron $r=0.81$.; $p<0.01$ para NG-NV, $r=0.89$; $p<0.01$ para NG-P, y $r= 0.85$; $p<0.01$ para las variables NV-P (Tabla 26 y 27).

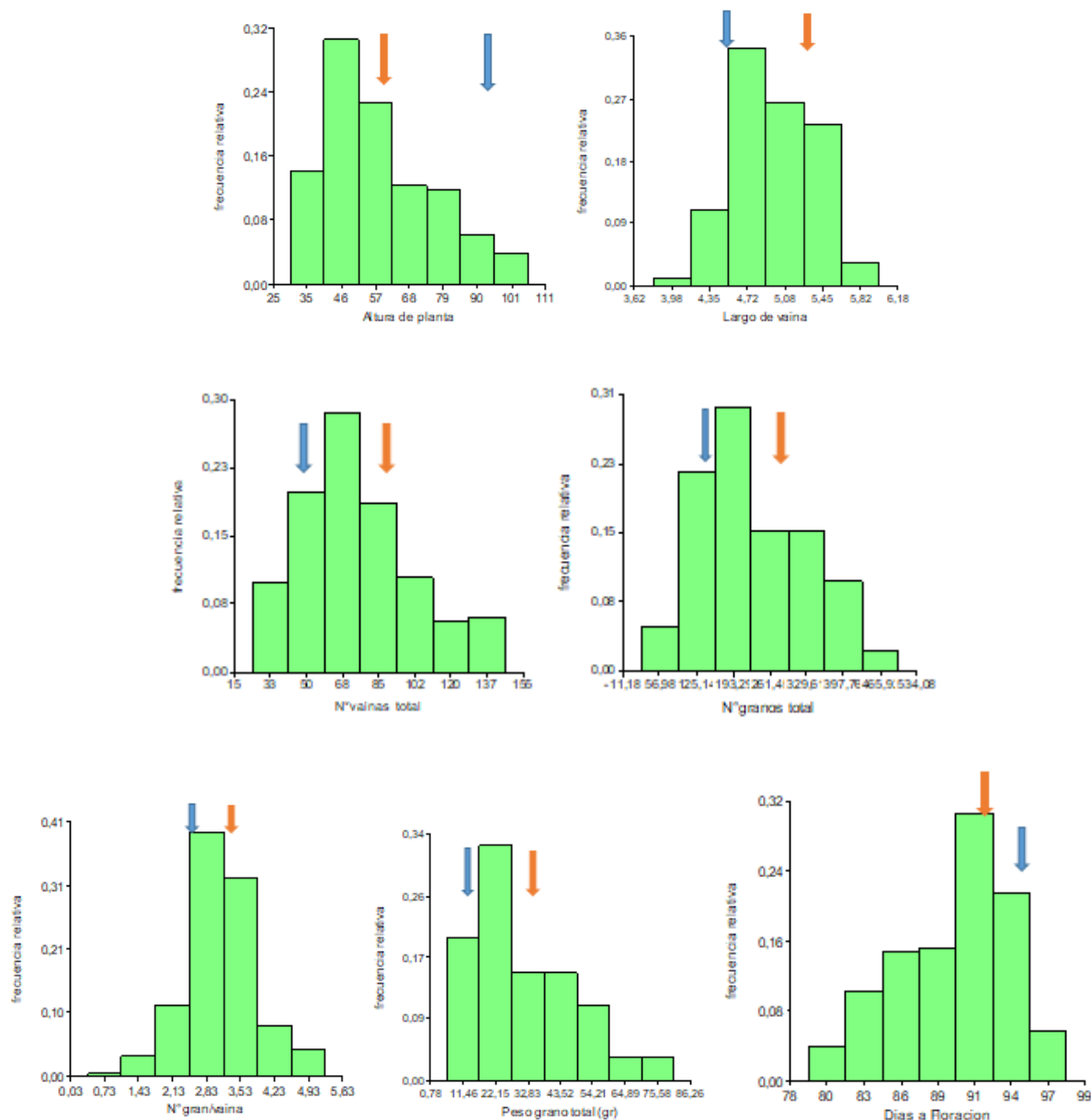


Gráfico 4: Distribuciones de frecuencias de los caracteres evaluados en la población F_{2.3} Verde. Altura de planta (cm), Longitud de la vaina (cm), Número de vainas por total, Número de granos total, Numero de granos por vaina, Peso de grano total (gr), Días a 50 % de floración de la parcela. Se indica con una flecha azul el valor promedio del parental IICA 5115 y con una flecha naranja el correspondiente a Turf.

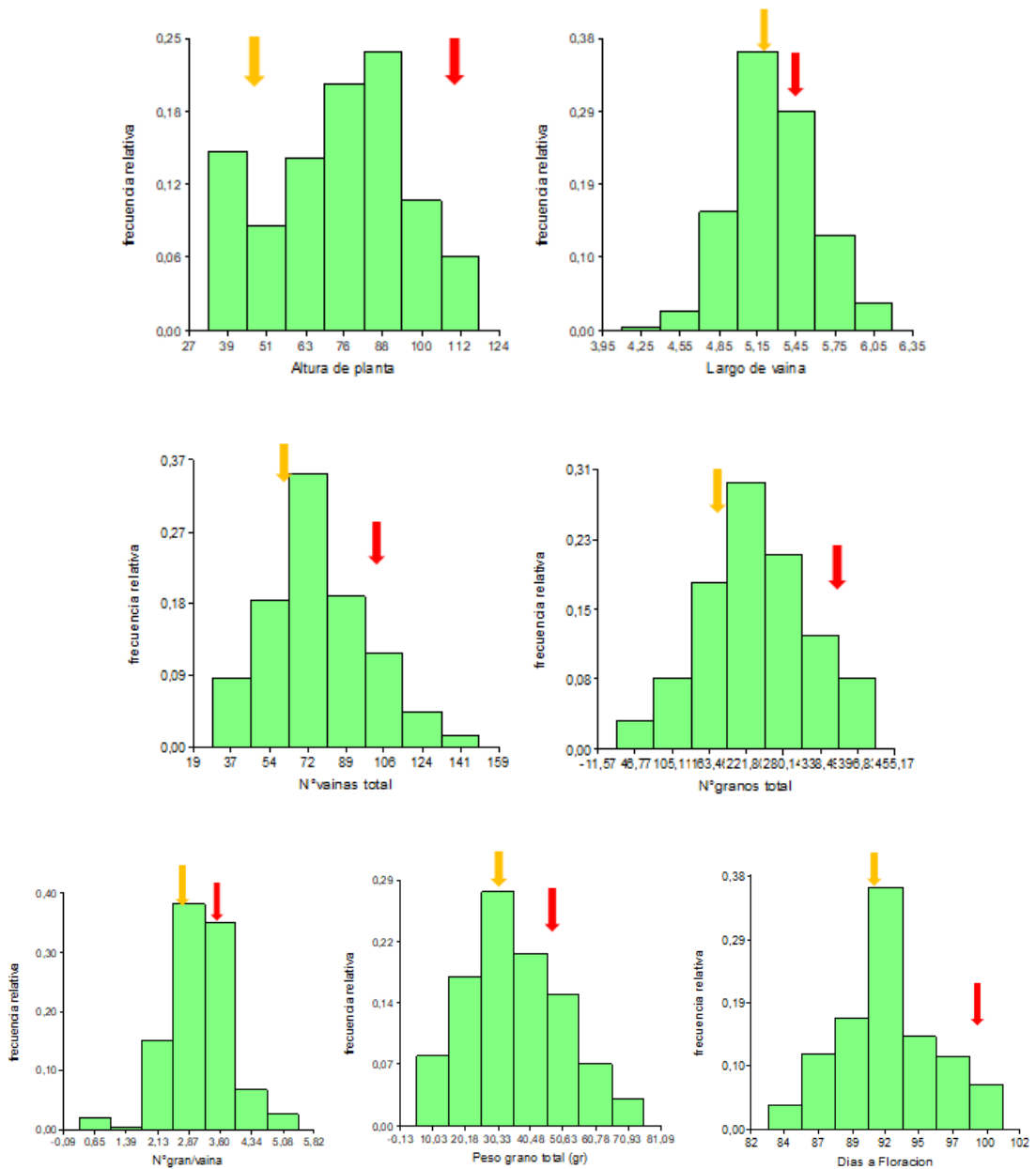


Gráfico 5: Distribuciones de frecuencias de los caracteres evaluados en la población F_{2.3} amarilla. Altura de planta (cm), Longitud de la vaina (cm), Número de vainas totales, Número de granos totales, Numero de granos por vaina, Peso de grano total (gr), Días a 50 % de floración de la parcela. Se indica con una flecha amarilla el valor promedio del parental Amarilla y con una flecha naranja el correspondiente a Zavalla 15.

8.2.3 Heredabilidad

A partir de los cuadrados medios del análisis de variancia (Tabla 3) se efectuaron las estimaciones de la heredabilidad en sentido estricto (h^2) para las diferentes variables y poblaciones F_{2.3}, mientras que para las poblaciones F₂, la heredabilidad en sentido amplio se obtuvo siguiendo la fórmula propuesta por Mahmud y Kramer (1951) (Tabla 5).

Las estimaciones de heredabilidad proporcionan una indicación confiable de la mejora esperada a través de la selección. Según Slight (2005), la heredabilidad se puede clasificar como baja si el valor obtenido es inferior o igual a 0,20 ($h \leq 0,20$), media o moderada si los valores fluctúan entre 0,20 y 0,50 ($0,20 < h < 0,50$) y alta si los valores obtenidos son superiores a 0,50 ($h > 0,50$).

Como podemos observar en la (Tabla 5), en la población F_2 , tanto de cotiledón verde como amarillo se obtuvieron valores altos de heredabilidad para la mayoría de los caracteres. Sólo en la población F_2 de cotiledón verde se obtuvieron valores intermedios para la variable NG/V, mientras que en la población F_2 de cotiledón amarillo se obtuvieron valores intermedios para la variable NV.

En las poblaciones $F_{2,3}$ se obtuvieron valores altos para la mayoría de los caracteres evaluados excepto para NG/V que fue intermedio y para LV bajo en la población de arveja con cotiledones verdes y para las variables NG/V, P y LV en las familias con cotiledón de tipo amarillo que fueron intermedios. Es importante aclarar que la estimación de la heredabilidad a partir de ANDEVAs en familias $F_{2,3}$ está viciada por el componente de variación no aditiva que no se puede desglosar.

Cuando se comparan los valores obtenidos en las poblaciones de tipo verde en ambas generaciones se puede observar que el carácter NG/V se mantiene en el rango intermedio, mientras que para LV que en la población F_2 presenta un valor elevado, entre las familias $F_{2,3}$ es baja. En la población F_2 de tipo de cotiledón amarillo, como se mencionó anteriormente, todos los caracteres presentan valores altos de heredabilidad excepto para NV que posee un valor intermedio, mientras que en la generación $F_{2,3}$ el valor de NV es alto mientras que presenta valores intermedios de heredabilidad para NG/V, P y LV a diferencia de la población F_2 .

Variable	H ² F ₂ Verde	h ² F _{2,3} Verde	H ² F ₂ Amarilla	h ² F _{2,3} Amarilla
AP	0.83±0.06	0.80±0.07	0.99±0.08	0.83±0.07
LV	0.84±0.05	0.14±0.04	0.88±0.06	0.37±0.05
NV	0.93±0.07	0.78±0.06	0.32±0.04	0.78±0.07
NG	0.96±0.07	0.72±0.05	0.71±0.07	0.52±0.06
NG/V	0.42±0.05	0.38±0.04	0.73±0.06	0.26±0.05
P	0.96±0.08	0.79±0.07	0.79±0.06	0.48±0.07
DF	0.95±0.07	0.86±0.06	0.86±0.08	0.89±0.08

Tabla 5: Valores de heredabilidad con el error estándar correspondiente para las poblaciones F₂ y F_{2,3} de Arveja verde y amarilla para las variables Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos (NG); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF).

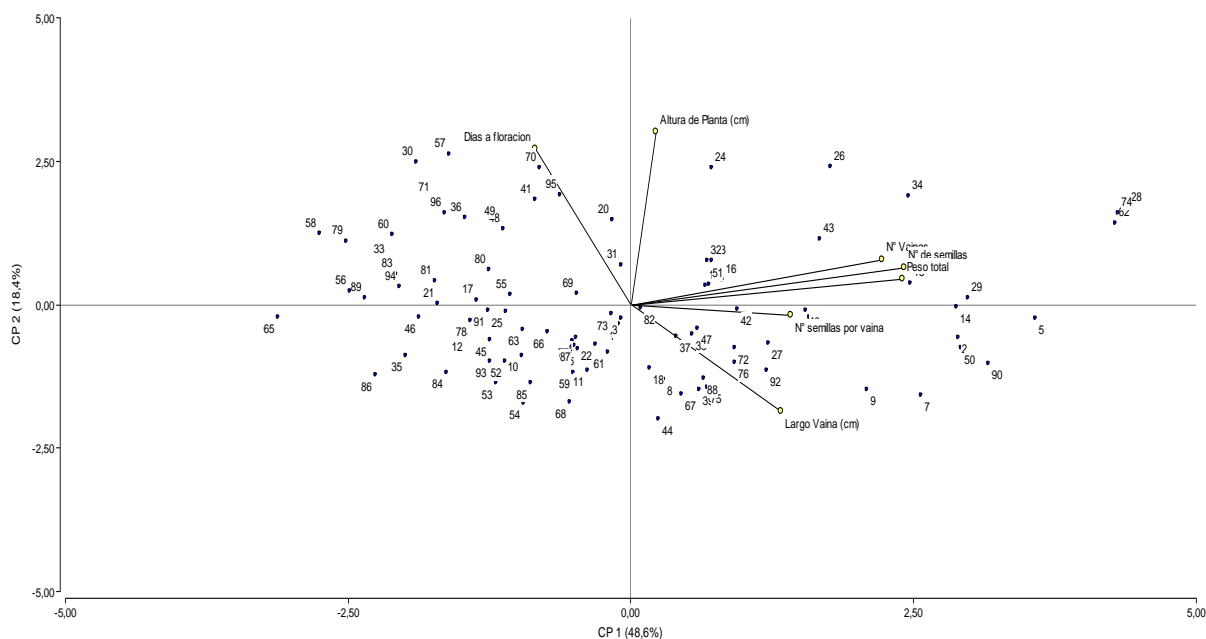
8.2.4 Análisis componentes principales F₂ y F_{2,3}

A partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) podemos graficar la variabilidad en función de todas las variables en conjunto y además determinar que variables contribuyen en mayor medida a la variación total existente.

En el análisis para la población F₂ verde se puede observar la amplia variabilidad presente entre los individuos. Con los primeros dos componentes principales CP₁ y CP₂ se explica el 67% de la variabilidad total. La CP₁ viene explicada principalmente por las variables productivas (NV, NGP, NG/V y P) mientras que la CP₂ está constituida por AP, DF y LV.

Con respecto al análisis para la población F₂ amarilla, también se observa la amplia variabilidad presente. Los primeros dos componentes principales CP₁ y CP₂ explican el 67,2% de la variabilidad total. Pero a diferencia de la población verde, el CP₁ viene explicada por AP, NG, P y NV mientras que la CP₂ por LV, NG/V y DF.

(a)



(b)

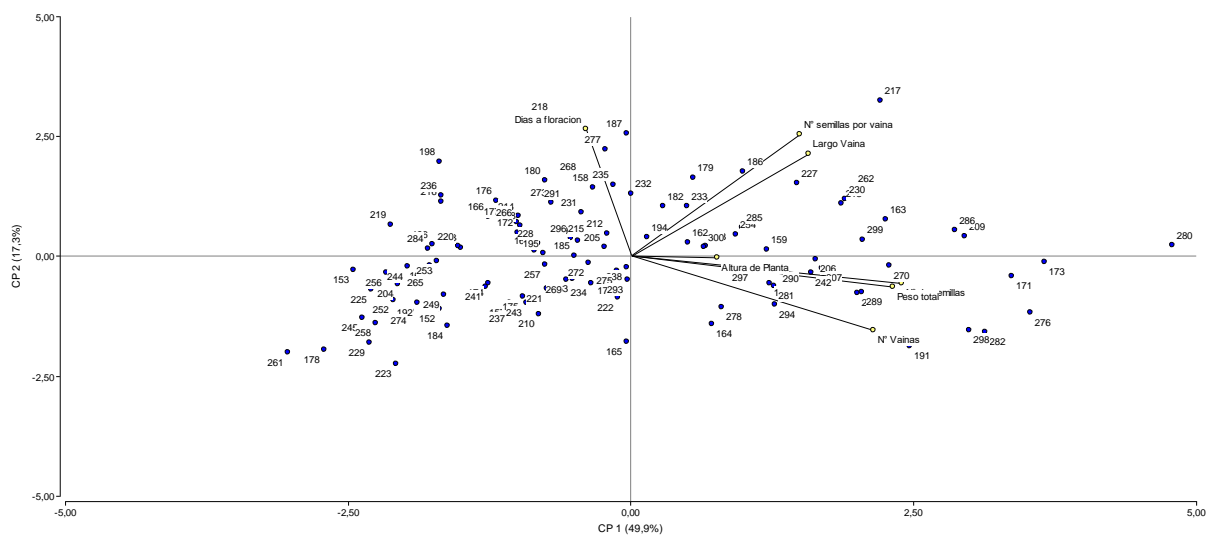


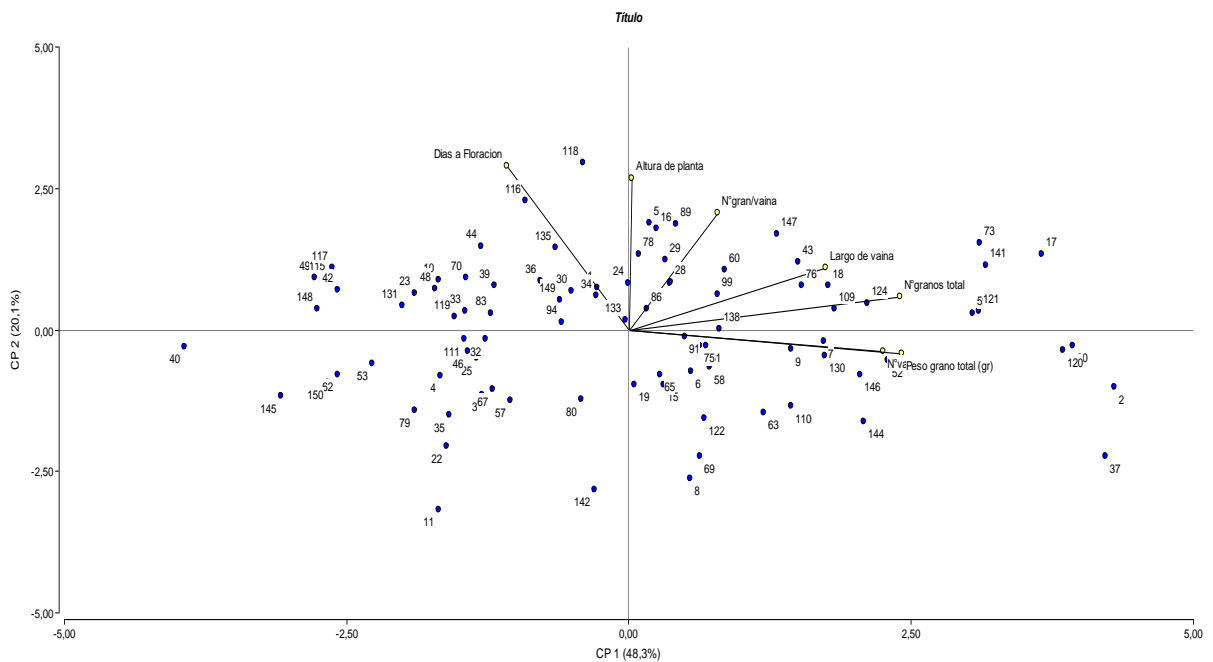
Gráfico 6: Análisis de componentes principales para las poblaciones F₂ Verde (a) y F₂ Amarilla (b).

El análisis de componentes principales de las familias F_{2.3} de arveja tipo verde muestra que con dos Componentes Principales (CP) se explica el 68 % de la variación total presente entre familias. La primera CP viene explicada principalmente por las variables productivas (NV, NG, LV y P) mientras que la CP₂ está constituida por la AP y los DF y en menor medida por NG/V. La distribución de las familias en función de ambas CP se muestra en el Gráfico 7-a. En el

mismo se puede observar una gran variabilidad entre las familias, las cuales demuestran una amplia distribución en el grafico en función de las variables analizadas.

En el análisis de componentes principales de las familias F_{2.3} de arveja amarilla los dos primeros Componentes Principales explican el 62 % de la variación total. Las componentes principales 1 y 2 están conformadas por las mismas variables que las familias F_{2.3} de arveja tipo verde. En el Gráfico 7-b realizado a partir de los dos primeros Componentes Principales (CP1 y CP2) podemos observar la distribución de las familias. Al igual que el grafico perteneciente a las familias verdes, se observa una gran variabilidad entre las familias, presentando una amplia distribución en el gráfico.

(a)



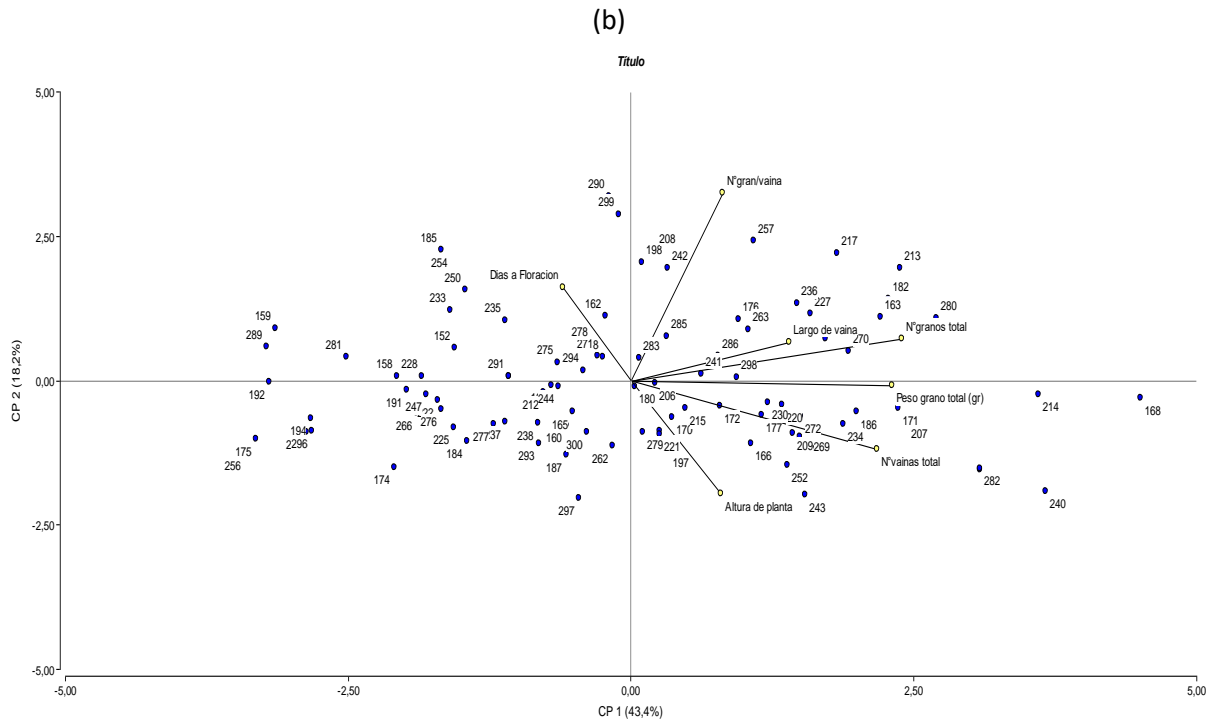


Grafico 7: Análisis de componentes principales para familias F_{2.3} Verde (a) y F_{2.3} Amarilla (b).

8.3 Aceleración de generaciones

A continuación, se exponen los resultados de las evaluaciones de los diferentes métodos y los resultados del método más eficiente utilizando las poblaciones segregantes F₂ antes mencionada:

8.3.1 Método *in-vitro*

El análisis del método *in vitro* no tuvo los resultados esperados, ya que, de todos los materiales evaluados, sólo dos plantas alcanzaron el período de floración. Ambas fueron obtenidas utilizando como explante plantas con el ápice removido, una perteneciente al cultivar Kaspá y la otra al cultivar Turf. El resto de las plantas no crecieron lo suficiente, produjeron callos y / o crecieron hasta la cima del tubo de cultivo y no mostraron signos de floración después de 90 días.

Variedad	Semilla entera		Explanto con ápice removido		Ápice	
	Sin Flur	0.6 µM Flur	Sin Flur	0.6 µM Flur	Sin Flur	0.6 µM Flur
Kaspá	0%	0%	0%	5%	0%	0%
Navarro	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Amarilla	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Turf	0%	0%	0%	5%	0%	0%

Tabla 6: Método *in vitro*. Porcentaje de plantas florecidas sobre un total de 10 explantos sembrados por tratamiento con dos repeticiones.

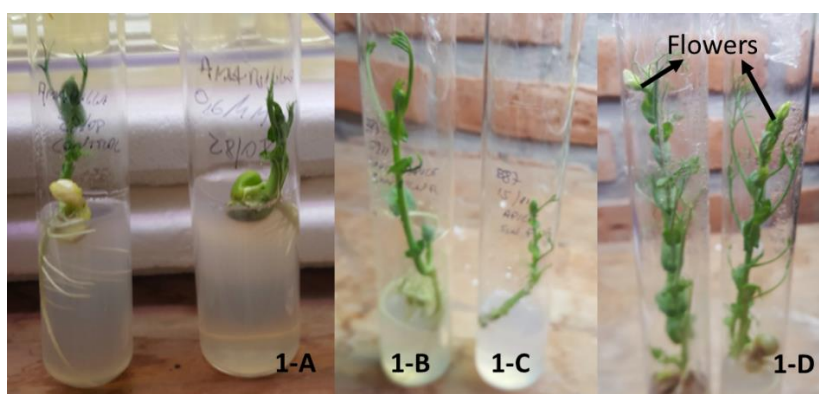


Figura 8: Método *in vitro* con diferentes explantos de arveja. **8-A** Semilla completa **8-B** Plántulas con el ápice removido. **8-C** Explanto de Ápice **8-D** Plantas con flores.

8.3.2 Método *in vitro-in vivo*

A continuación, se presentan los datos del método junto con el control (método a campo). Es importante aclarar que los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,90$. En la Tabla 7 se observa el análisis de la varianza realizado con el fin de determinar diferencias significativas entre el método *in vitro-in vivo* y su control. Se compararon las variables altura de planta y días a ciclo completo con su respectivo control. Para realizar el análisis se tomaron los datos de las variables de todas las variedades evaluadas bajo el mismo método en conjunto y se compararon con los datos del control a campo. También se muestran los datos obtenidos del ensayo y del ensayo realizado con el fin de comparar dos medios (Medio MS y Perlita), utilizados para el rescate de embriones inmaduros 18 días después de antesis. Tabla 8 a y b.

	AP			DCC	
	GI	CM	F	CM	F
Métodos	1	6400	17.28*	13340	367.83*
Error	8	370.27		36.27	

Tabla 7: Análisis de varianza para la comparación de las variables altura de planta (AP) y días a ciclo completo (DCC), entre el método *in vitro-in vivo* y su control a campo. F: Prueba F de Snedecor. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad $p < 0.05$.

	Método <i>in vivo – in vitro</i>				Método a campo			
	Kaspa	Amarilla	Zav15	Turf	Kaspa	Amarilla	Zav15	Turf
AP (cm)	28 ^a	29 ^a	35 ^a	25 ^a	57 ^b	51 ^b	112 ^b	58 ^b
DF	67	65	78	71	97	91	98	93
DCC	85 ^a	83 ^a	96 ^a	89 ^a	149 ^b	142 ^b	152 ^b	145 ^b
Eficiencia	79	76	49	71	77	78	67	75

Tabla 8a: Altura de planta (AP), Días a floración (DF), Días del ciclo completo (DCC) y eficiencia del método por variedad tanto en el método *in vivo – in vitro* y su testigo a campo. Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$

Variedad	Medio MS (%)	Perlita (%)
Kaspa	100	100
Amarilla	100	95
Zavalla 15	100	100
Turf	60	100

Tabla 8b: Porcentaje de embriones germinados por sustrato y variedad. Se sembraron 30 embriones por variedad y sustrato, en un diseño aleatorio completo con dos repeticiones.

La Tabla 8a muestra que el sistema *in vitro* – *in vivo* con la aplicación de flurprimidol produjo una considerable reducción de la altura de planta desde un 51% para la variedad Kaspa a un 69% para la variedad Zavalla 15. El análisis de varianza mostró que la disminución en la altura entre métodos fue altamente significativa ($F=17.528$; $p<0.001$) para esta característica. Los días a floración como así también los días a ciclo completo, tuvieron disminuciones considerables con respecto a las variedades sembradas a campo, siendo los días a floración de 67 días para Kaspa, 65 días para Amarilla, 78 días para Zavalla 15 y 71 días para Turf, mientras que a campo estas variedades necesitaron 97, 91, 98 y 95 días para florecer respectivamente. La misma tendencia se observa en los días a ciclo completo los que se vieron reducidos mediante la utilización del método *in vitro* – *in vivo*, siendo los mismos 85 días para Kaspa, 83 días para Amarilla, 96 días para Zavalla 15 y 89 días para Turf ($F=367.83$; $p<0.001$). Es importante recordar que la diferencia entre ciclo completo y días a floración es de 18 días, momento en el cual se realiza el rescate de embriones. Con esta metodología podrían realizarse en promedio 4 generaciones por año.

En lo que respecta a la eficiencia, el método *in vitro* – *in vivo* con su control poseen valores similares excepto en la variedad Zavalla 15 (método *in vitro* – *in vivo*) que mostro una eficiencia del 49%, lo que es considerada baja. Teniendo en cuenta que esta es una variedad foliosa y

que su manejo se dificulta en la metodología *in vitro-in vivo* demostraría una poca adaptación de este tipo de materiales al sistema *in vitro-in vivo*.

Con relación al rescate de embriones, los sustratos evaluados fueron altamente eficientes para generar plántulas a partir de embriones de 18 DAP, sin embargo la utilización del medio MS tiene el inconveniente de producir algunas plántulas con un reducido desarrollo radical, otras con desarrollos de callos, además de ser un sustrato de elevado precio por lo que su incorporación en un programa de mejora elevaría los costos del mismo, mientras que la perlita tiene un costo accesible y su manejo es más fácil.



Figura 9: 9-A Sistema hidropónico simplificado para métodos *in vivo* e *in vitro* – *in vivo* usando perlita como sustrato y solución hidropónica en bandeja. 9-B Flores y vainas en el sistema *in vivo*.

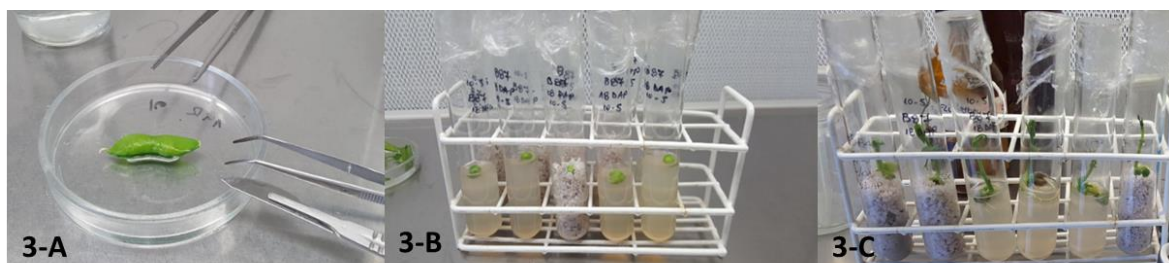


Figura 10: 10-A Rescate de embriones 18 días después de floración. 10-B Siembra de embriones en perlita y en medio MS. 10-C Germinación de embriones.

8.3.3 Método completamente *in vivo*

Al igual que en el método anterior, se muestra los resultados del análisis de la varianza realizado con el fin de comparar el método con su control a campo. Los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,85$. Se realizaron las comparaciones para altura de planta y días a ciclo completo, los cuales son los objetivos del presente trabajo.

Luego se observan los resultados obtenidos mediante la utilización de este sistema (Tabla 10).

	Altura			Días a ciclo completo	
	GI	CM	F	CM	F
Métodos	1	8930,25	23,98*	20592,25	680,74*
Error	8	372,39		30,25	

Tabla 9: Análisis de varianza realizado con el fin de comparar el método in vivo con su control a campo. F: Prueba F de Snedecor. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

	Método <i>in vivo</i>				Método a campo			
	Turf	Amarilla	Zav15	Ilca5115	Turf	Amarilla	Zav15	Ilca5115
AP (cm)	24 ^a	27 ^a	36 ^a	38 ^a	58 ^b	51 ^b	112 ^b	93 ^b
DF	48	46	57	55	93	91	98	95
DCC	72 ^a	70 ^a	81 ^a	79 ^a	145 ^b	142 ^b	152 ^b	148 ^b
Eficiencia (%)	93	95	51	58	75	78	67	68

Tabla 10: Comparación de las diferentes variedades evaluadas para Altura de planta (AP), días a floración (DF), días a ciclo completo (DCC) y la eficiencia del método. Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas entre los métodos al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

Este método mostró mayores eficiencias en la obtención de vainas cuando se lo evaluó sobre las diferentes variedades, siguiendo la misma tendencia que se mencionó anteriormente en el método *in vitro* – *in vivo*, donde las variedades semi-áfilas (Turf y Amarilla) mostraron una mayor eficiencia sobre las variedades foliosas (93 y 95%) vs (51 y 58%). La altura de planta varió entre 24 cm y 27 cm (Turf y Amarilla respectivamente) en las variedades semi-áfilas y entre 36 cm y 38 cm en las variedades foliosas (Zavalla 15 e Ilca 5115), presentando esta una considerable reducción cuando se lo compara con los materiales a campo que tuvieron valores entre 51 cm y 112 cm. Siendo estas diferencias altamente significativas ($F=23.98$; $p < 0.001$).

Las variedades semi-áfilas tuvieron una reducción de aproximadamente 52% su tamaño, mientras que en las variedades foliosas la reducción fue mayor siendo aproximadamente de 63%.

Los días a floración de los materiales en el método *in vivo* variaron entre 46 días para el cultivar Amarilla y 57 días para el cultivar Zavalla 15, mientras que estos dos materiales evaluados a campo requirieron 91 y 98 días para florecer respectivamente. Lo mismo ocurre con los días a ciclo completo, ya que como se menciona anteriormente los días a ciclo completo ocurren 24 días después de floración. Cuando observamos el análisis de varianza para los días a ciclo completo, el mismo mostro diferencias altamente significativas ($F=680.74$, $p<0.001$).

Cuando observamos la eficiencia de los métodos, los materiales a campo presentan valores inferiores para las variedades semi-áfilas, pero no así para las variedades foliosas. Esto pone en evidencia nuevamente la poca adaptación de este tipo de materiales al sistema *in vivo*.

Cuando comparamos la eficiencia de las tres metodologías se concluye que el método *in vivo* es el más factible a ser incorporado en un programa de mejora ya que el método completamente *in vitro* mostro resultados muy pobres además del costo generado por los medios de cultivo y las instalaciones necesarias. Con el método *in vitro – in vivo*, los resultados fueron más alentadores sin embargo cuando se los comparo con el método *in vivo*, este último tuvo una reducción en los días a ciclo completo ($F=10.62$, $p<0.01$). Además, al utilizar medios de cultivos sus costos son considerablemente mayores y el rescate de embriones es una técnica que requiere de mano de obra calificada. Por estas razones se decidió la aplicación del método *in vivo* sobre las poblaciones F_2 y F_3 .

	Días a ciclo completo		
	GI	CM	F
Métodos	1	325.13	10.62*
Error	8	30.63	

Tabla 11: Análisis de la varianza para la comparación del método *in vitro-in vivo* y el método *in vivo* F: Prueba F de Snedecor. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad $p < 0.05$.

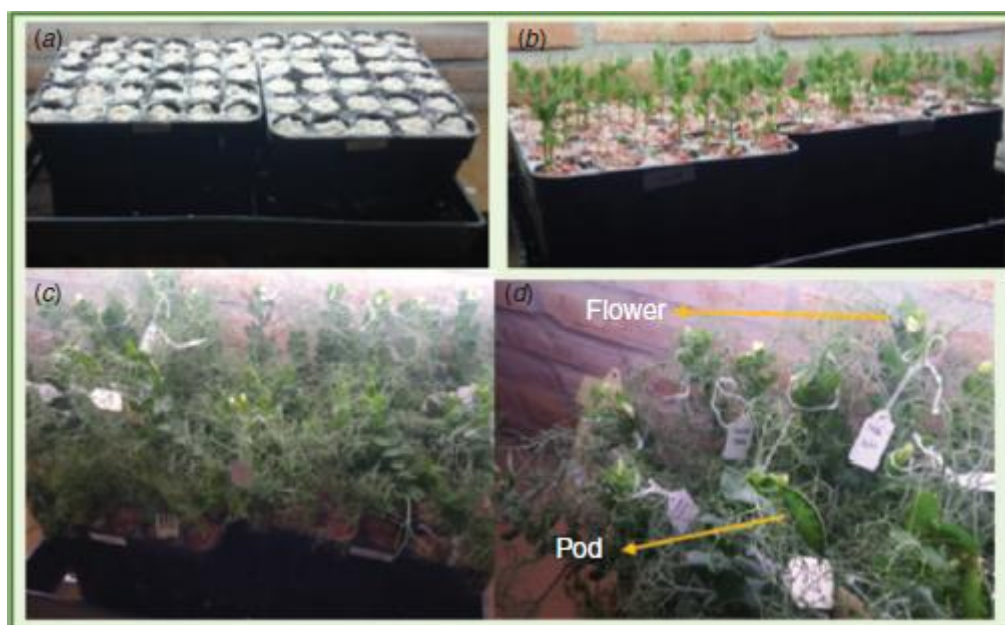


Figura 11: Sistema de *Speed breeding* (*in vivo*) simplificado (a) Siembra en bandejas utilizando perlita como sustrato y solución hidropónica en bandeja; (b) plántulas de arvejas creciendo en las bandejas; (c) planta adulta con flores y vainas (d) flores y vainas.

8.3.4 Evaluación del Método *in vivo* utilizando Poblaciones segregantes

El análisis de varianza realizado para comparar las poblaciones segregantes utilizadas en el método *in vivo* y el método a campo (control) mostro diferencias altamente significativas. Los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,85$.

	Altura			Días a ciclo completo	
	GI	CM	F	CM	F
Métodos	1	3200	85.71*	11325	1241.11*
Error	8	37.23		9.13	

Tabla 12: Análisis de varianza realizado para comparar ambos métodos (*in vivo* y control). F: Prueba F de Snedecor. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$

	Método <i>in vivo</i>				Método a campo			
	F ₂	F ₂	F ₃	F ₃	F ₂	F ₂	F ₃	F ₃
	Verde	Amarilla	Verde	Amarilla	Verde	amarilla	verde	Amarilla
AP (cm)	33 ^a	31 ^a	30 ^a	32 ^a	68 ^b	82 ^b	62 ^b	74 ^b
DF	45	46	41	47	96	94	90	92
DCC	69 ^a	70 ^a	65 ^a	71 ^a	148 ^b	145 ^b	140 ^b	143 ^b
Eficiencia (%)	78	76	75	74	61	64	68	71

Tabla 13: Altura promedio a cosecha (AP) (cm), días a floración (DF) y a ciclo completo (DCC) y eficiencia del método (%) y su control a campo en las poblaciones segregantes. Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas entre los métodos al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$

Las poblaciones segregantes (Tabla 13) mostraron valores intermedios con respecto las variedades evaluadas *in vivo*. La altura al igual que con las variedades se redujo considerablemente, tomando valores de alrededor de 30 cm para ambas poblaciones y generaciones por efecto del flurprimidol mientras que, a campo estas poblaciones tuvieron una altura promedio superior. El análisis de varianza indicó que existen diferencias altamente significativas entre el método y su control para la altura ($F=85.71$; $P < 0.001$). El ciclo completo en este sistema, calculando el mismo desde la siembra a la cosecha de vainas, osciló entre los 65 y los 70 días en ambas poblaciones y generaciones, permitiendo así la realización de

5 generaciones por año y demostrando diferencias altamente significativas con el método a campo ($F=1241.11$, $P<0.001$). La eficiencia del sistema vario entre 74% y 78%, siendo mayor cuando la comparamos con los otros métodos y siendo intermedia cuando la comparamos con las variedades evaluadas en el método *in vivo*. Mientras que si la comparamos con el método a campo resulto ser mayor, mostrando los materiales a campo una eficiencia entre 61% para la F₂ verde y 71% para la F₃ amarilla. A continuación, se presenta un gráfico con la comparación de las diferentes variedades y poblaciones evaluada en el método *in vivo* y otro en el que nos muestra la cantidad de generaciones de arveja que se pueden obtener por año mediante los diferentes métodos evaluados.

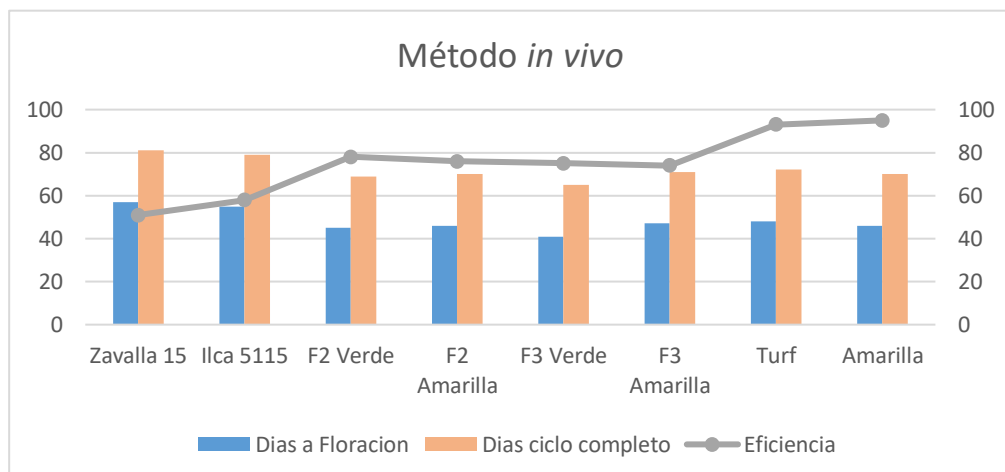


Gráfico 8: Comparación de las diferentes variedades y poblaciones segregantes evaluadas en el método *in vivo*.

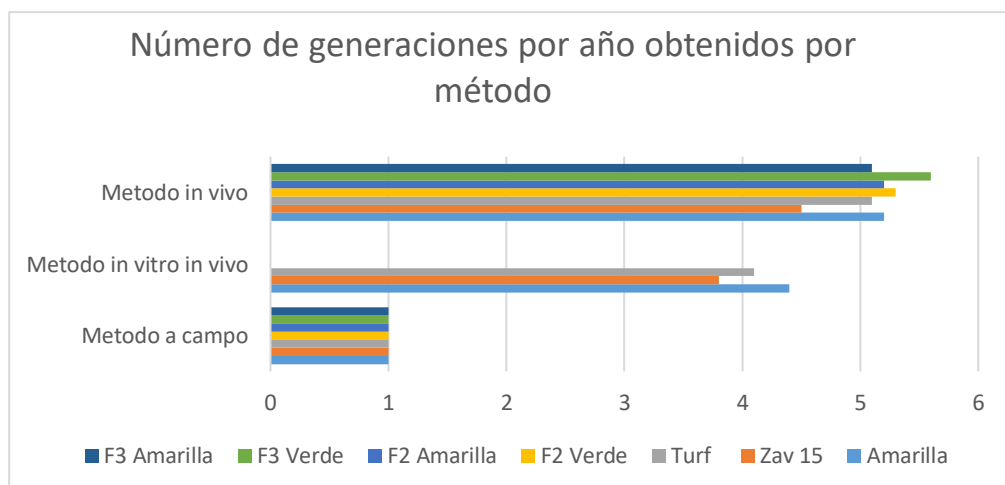


Gráfico 9: Generaciones de arveja por año obtenidas mediante los diferentes métodos.

8.4 Análisis de la variabilidad de las Rils obtenidas por los diferentes métodos.

A continuación, se exponen los resultados de los valores promedios (Me), de los coeficientes de variación (CV) y los rangos (R) de las Rils sembradas a campo, tanto las que provienen del método SSD convencional como las obtenidas por el método *Speed breeding* (SSD *in vivo*) y la eficiencia de los métodos en la conservación de la variabilidad. Las Rils obtenidas por ambos métodos fueron comparadas con las familias F_{2,3}, también se agregaron los valores de las poblaciones F₂ de las cuales se partió, las cuales no fueron incluidas en la comparación (debido a que los caracteres se obtuvieron de plantas individuales) pero si nos da una referencia de la variabilidad de partida que ya fue analizada anteriormente.

	F ₂ verdes campo			F _{2,3} verdes a campo			Rils verdes SSD			Rils verdes de SB		
	Me	CV	R	Me	CV	R	Me	CV	R	Me	CV	R
AP	68.3	36	33-121	57.9 ^b	13.3	31-104	50,3 ^a	22,6	31,5-90	52,96 ^{a,b}	28,48	31,5-87
LV	5.2	9.5	4-6.2	4.8 ^c	7.3	4.4-5.6	4,52 ^b	7,65	3,75-5,5	4,37 ^a	11,37	3,75-5,55
NV	21.9	62.8	2-72	73.9 ^b	26.5	26-142	43,43 ^a	30,0	14,5-75,5	36,78 ^a	40,83	14-63,5
NG	58.2	73	2-246	229 ^b	31.8	70-454	137,1 ^a	33,6	36-268,5	123,49 ^a	46,85	44,5-257
NG/V	2.6	22.9	0.7-4.3	3.1 ^a	20.7	1.7-4.9	3,18 ^a	17,5	1,84-4,22	3,32 ^a	17	2,1-4,36
P	10.6	86.9	7.5-25.4	31.4 ^b	37	6-66	19,99 ^a	43,1	4 - 49,5	17,58 ^a	54,07	4,5 - 41,5
DF	95.8	5.1	86-112	89.7 ^c	1.7	79-96	84,3 ^a	5,29	76,5-91,1	87,58 ^b	5,62	76,5 - 93

Tabla 14: Valores medios, coeficientes de variación (CV) y rango (R) de las familias F_{2,3} y Rils de arvejas verdes provenientes de los métodos SSD a campo y *Speed breeding* para las variables altura de planta al momento de cosecha (AP); largo de vaina (LV); número de vaina por parcela (NV); número de grano por parcela (NG); número de grano por vaina (NG/V); Peso total de grano por parcela (P) y floración del 50% de la parcela (DF). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas entre los métodos al 5 % de probabilidad. p<0.05

Como se puede observar en la Tabla 14 a pesar de tener las Rils valores promedios inferiores en comparación con las familias F_{2,3}, los CV resultaron mayores. Esto se observa en la mayoría de las variables excepto en NG/V y Df. Debe tenerse presente que los valores presentados para las poblaciones F_{2,3} corresponden a condiciones ambientales diferentes de las condiciones ambientales de las Rils. Cuando observamos los rangos y comparamos las

familias $F_{2,3}$ con las Rils, tienden a ser similares en caracteres como AP, LV, NG/V y DF, sin embargo, para los caracteres productivos NV, NG y P en las Rils de ambos sistemas fueron menores, y en algunos casos tomaron valores máximos a la mitad de las familias $F_{2,3}$. Los valores de CV fueron mayores para la mayoría de los caracteres de las Rils en comparación de las familias $F_{2,3}$. Lo que demuestra que a pesar de que los rangos fueron menores, la variabilidad continúa siendo significativa. Cuando analizamos la población F_2 y la comparamos con las demás poblaciones presentes, los valores promedio, los CV y los rangos resultaron superiores (a excepción del valor de CV en LV perteneciente a las Rils obtenidas por SB y a los CV de DF de ambas Rils). Esto es esperable ya que como se mencionó en la comparación de las F_2 con sus respectivos $F_{2,3}$, los caracteres de las poblaciones F_2 son obtenidos a partir de plantas individuales a diferencia de los datos de las demás poblaciones que se obtuvieron a partir de los promedios de parcela con una repetición. También es importante considerar que, en generaciones tempranas hay alta frecuencia de heterocigotas, que por acciones génicas de sobredominancia, también pueden ampliar el rango de variación.

Al comparar las Rils provenientes de ambos sistemas, podemos observar que son similares tanto en sus valores promedios como en sus rangos. Sin embargo, cuando los comparamos con las familias $F_{2,3}$ observamos valores menores. Esta misma tendencia también se observó cuando se compararon los materiales parentales sembrados los diferentes años. Siendo el año 2020, en el que también se sembraron las Rils, el año con valores menores para todos los caracteres evaluados. Es por eso que la variable ambiental tuvo una gran influencia en la evaluación de estos caracteres. Sin embargo, los valores similares de las variables entre las Rils, tanto en los valores medios, en el CV como en los rangos, demuestra que para esta población la variabilidad resultó similar, más allá del método utilizado para avanzar generaciones.

	F ₂ amarillas			F _{2.3} amarillas			Rils amarillas SSD			Rils amarillas SB		
	Me	CV	R	Me	CV	R	Me	CV	R	Me	CV	R
AP	81.7 ^d	29.8	28-122	74.0 ^c	11.6	36-106	67,9 ^b	24,48	34–101,5	62,14 ^a	28,64	32–103,5
LV	5.53 ^b	8.7	4.3-6.7	5.3 ^b	5.7	4.5-6	4,68 ^a	8,21	3,6–5,4	4,57 ^a	8,03	3.7–5,55
NV	16.6	62.1	3-58	76.3 ^b	20.7	39-143	48,07 ^a	26,27	18,5–79,5	41 ^a	39,52	19–78,5
NG	43.7	61.3	15-203	237.2 ^b	27.1	104-403	144,81 ^a	33,84	38,5–293,5	125,21 ^a	40,01	35,5–227
NG/V	2.53	28.5	1-4.8	3.1 ^a	18.5	1.5-4.5	2,98 ^a	18	1,71–4,54	3,07 ^a	20,12	1.9–4,6
P	8.58	76.8	7.4-31.4	35.5 ^b	34.9	12-69	24,74 ^a	37,84	4,5 – 50,5	20,67 ^a	49,5	5 – 42,5
Df	94.1 ^b	5.9	85-105	92.0 ^b	1.2	83-100	85,57 ^a	4,59	77,5 – 91,5	85,45 ^a	6,38	71,5–93,5

Tabla 15: Valores promedios, coeficientes de variación (CV) y rango (R) de la población F₂, las familias F_{2.3} y Rils de arvejas amarillas provenientes de los métodos SSD a campo y *Speed breeding* para las variables altura de planta al momento de cosecha (AP); largo de vaina (LV); número de vaina por parcela (NV); número de grano por parcela (NG); número de grano por vaina (NG/V); Peso total de grano por parcela (P) y floración del 50% de la parcela (DF). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas entre los métodos al 5 % de probabilidad. p<0.05

En la Tabla 15 podemos observar la misma tendencia que las poblaciones de arveja verde. Los valores promedios resultaron ser menores cuando se comparan los dos conjuntos de Rils con las familias F_{2.3}. Esta tendencia se manifiesta en mayor medida en los caracteres productivos, NV, NG y P. Sin embargo, los valores de CV para los caracteres de las Rils resultaron ser mayores que para los caracteres de las familias F_{2.3}, demostrando como en la población de arveja amarilla, que a pesar de tener valores promedios menores la variabilidad continuó siendo significativamente alta. Por otro lado, cuando comparamos entre sí los dos conjuntos de Rils, podemos observar resultados análogos a la población verde, debido a que poseen valores similares en los valores promedios, los CV y los rangos, sin embargo, algunos caracteres presentan diferencias como, el valor promedio y el CV de la variable NG y el CV en P, que a pesar de ser significativas no representan grandes diferencias. Estos datos nos demuestran que, para estas variables, ambos métodos presentaron resultados similares en referencia a la conservación de la variabilidad. Mientras que como en la población verde,

cuando comparamos estos resultados con los valores de la población F₂ los valores promedio, los CV y los rangos resultaron inferiores. Esto, como se mencionó en la población anterior, se explica por la diferencia en el origen de los datos (planta individual para F₂ y promedio de parcela con una repetición para las otras poblaciones).

Con respecto al análisis de varianza realizado sobre cada conjunto de Rils, todos demostraron diferencias entre las líneas. Estos datos también se utilizaron para calcular los valores de Heredabilidad que se muestran a continuación

	AP			LV		NV		NG	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Amarillas									
Campo	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	69	552,5	5,83*	0,3	2,27*	318,9	1,9*	4804,0	2,14*
Error	70	94,77		0,13		168,14		2214,6	

	NG/V			P		DF	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	69	0,57	3,74*	175,24	1,73*	30,88	4,04*
Error	70	0,15		101,5		7,64	

Tabla 16: Análisis de varianza para las Rils de arveja amarilla obtenidas por el método SSD a campo. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. p<0.05.

Ama SB	AP			LV		NV		NG	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	42	633,36	39,53*	0,27	11,34*	524,98	18,25*	5018,2	17,54*
Error	43	16,02		0,02		28,77		286,02	

	NG/V			P		DF	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	42	0,77	11,45*	209,5	7,8*	59,47	25,7*
Error	43	0,07		26,96		2,31	

Tabla 17: Análisis de varianza para las Rils de arveja amarilla obtenidas por el método SB a campo. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

Verde SB	AP			LV		NV		NG	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	44	455,66	68,49*	0,49	35,89*	450,9	27,42*	6694,1	39,78*
Error	45	6,64		0,01		16,44		168,27	

	NG/V			P		DF	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	44	0,63	11,26*	180,64	46,19*	48,41	21,36*
Error	45	0,06		3,91		2,27	

Tabla 18: Análisis de varianza para las Rils de arveja verde obtenidas por el método SB. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

Verdes Campo	AP			LV		NV		NG	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	58	258,4	4,69*	0,24	2,11*	340,7	2,04*	4249,1	2,42*
Error	59	55,4		0,11		166,8		1759,3	

	NG/V		P		DF		
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Familia	58	0,63	11,26*	180,64	46,19*	48,41	21,36*
Error	59	0,06		3,91		2,27	

Tabla 19: Análisis de varianza para las Rils de arveja verdes obtenidas por el método SSD a campo. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF). ns: Diferencias no significativas. *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

	h_2			
	Rils amarillas	Rils amarillas	Rils verdes	Rils verdes
	SSD campo	SB	SSD campo	SB
AP	0,71±0,06	0,95±0,07	0,65±0,06	0,97±0,09
LV	0,39±0,04	0,96±0,09	0,37±0,03	0,96±0,08
NV	0,31±0,06	0,89±0,07	0,34±0,07	0,56±0,03
NG	0,37±0,06	0,89±0,04	0,41±0,06	0,95±0,07
NG/V	0,58±0,07	0,83±0,06	0,83±0,05	0,82±0,09
P	0,26±0,05	0,77±0,07	0,96±0,09	0,96±0,06
DF	0,60±0,08	0,92±0,07	0,91±0,08	0,91±0,07

Tabla 20: Valores de heredabilidad en sentido estricto para las poblaciones Rils obtenidas por los métodos SSD a campo y SB de Arveja verde y amarilla para las variables Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV), Número de vainas por planta (NV); Número de granos por planta (NGP); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por planta (P) y días a aparición de la primera flor (DF).

Los valores de la heredabilidad en sentido estricto calculados a partir del ANDEVA, mostraron según la clasificación de Singh (2005), valores altos para AP, NG/V y DF en las Rils amarillas obtenidas por el SSD a campo, AP, NG/V, P y DF en las Rils verdes obtenidas por SSD a campo y para todos los caracteres de las Rils proveniente de SB de ambas poblaciones.

Mientras que mostraron valores intermedios para LV, NV y NG para ambas poblaciones de las Rils obtenidas a campo, y para P de las Rils amarillas obtenidas por SSD a campo. Se analizaron también las correlaciones entre las diferentes variables encontrando correlación entre, NG-NV ($r=0.83$; $p<0.01$), NG-P ($r=0.92$; $p<0.01$), NV-P (0.81 ; $p<0.01$) y NG-LV ($r=0.72$; $p<0.01$) para la población verde, mientras que para la población amarilla NG-NV ($r=0.88$; $p<0.01$), NG-P ($r=0.91$; $p<0.01$), NV-P (0.88 ; $p<0.01$) y NG-LV ($r=0.7$; $p<0.01$) (Tabla 26 y 27). Con el objetivo de graficar mejor la distribución de la variabilidad en las diferentes poblaciones se realizó un análisis de componentes principales en los que se comparó los diferentes valores de las familias $F_{2,3}$, con las Rils provenientes del método SSD a campo como las provenientes del *Speed breeding*. Este análisis se realizó tanto para las poblaciones de arveja verde como la amarilla.

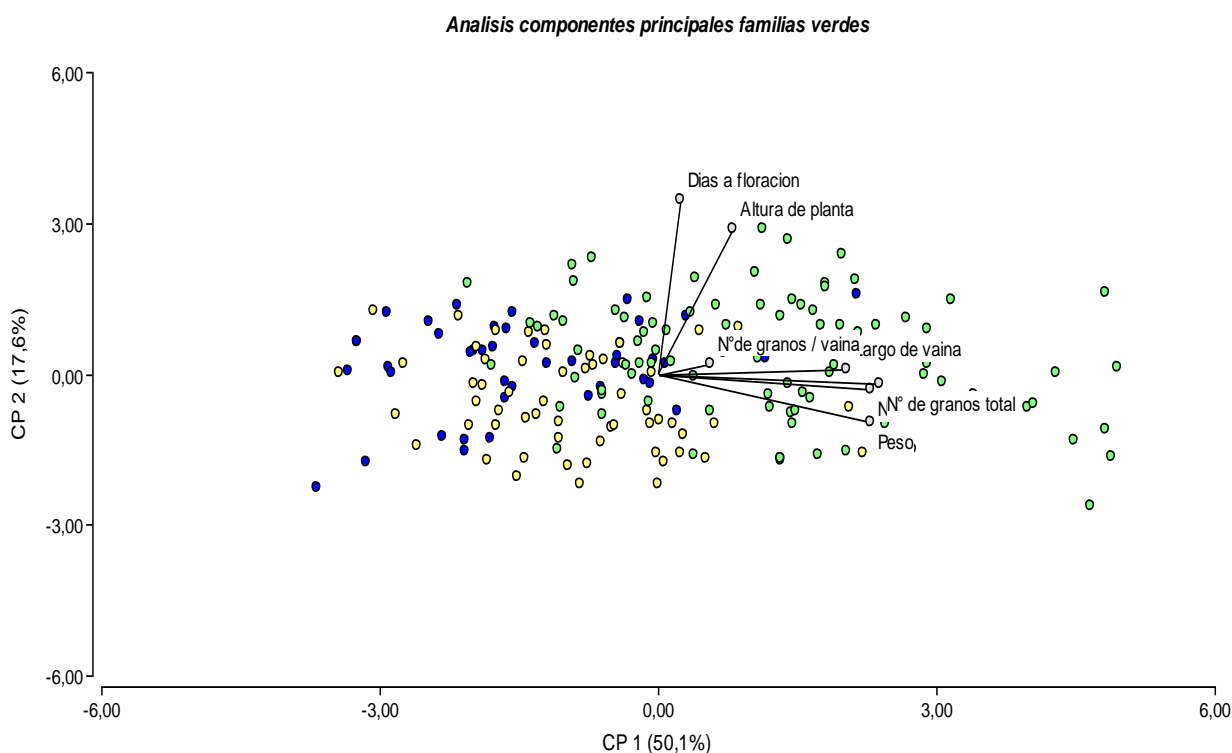


Gráfico 11: Análisis de componentes principales de familias verdes. Los puntos verdes representan a las diferentes familias $F_{2,3}$, los puntos amarillos a las Rils proveniente del SSD a campo y los puntos azules provienen de las Rils obtenidas por *Speed breeding*.

En el Gráfico 11 podemos observar el diagrama de distribución para los materiales de tipo verde. Los dos primeros CP representan el 67,7 % de la variabilidad total. Se puede observar

que los valores de las Rils, difirieron de las familias $F_{2,3}$, las cuales se agruparon mayoritariamente en el extremo derecho de dicho gráfico. A pesar de esa diferencia marcada, no se observan grandes diferencias entre las Rils provenientes del método SSD a campo y las Rils provenientes de *Speed breeding*. Estos resultados van en concordancia con los demostrados en la Tabla 14, pero aquí es posible representar mejor la dispersión de la variabilidad entre las diferentes poblaciones.

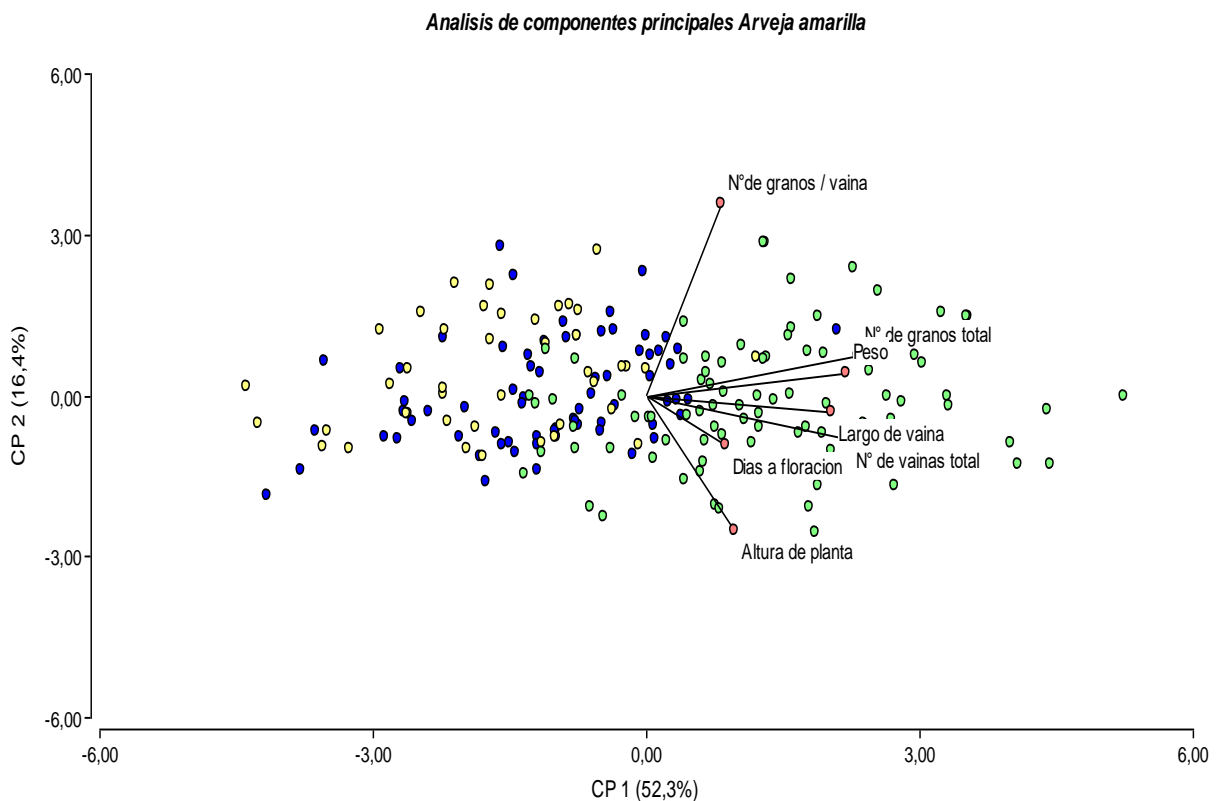


Gráfico 12: análisis de componentes principales de arveja amarilla. En el mismo los puntos verdes representan a las familias $F_{2,3}$, los puntos amarillos a las Rils provenientes de *Speed breeding* y los puntos azules a las Rils provenientes del SSD a campo.

En el Gráfico 12 se observa el diagrama de componentes principales realizado a partir de los diferentes materiales de arveja amarilla. Los dos primeros CP representan el 68,7 % de la variabilidad total. Se observa la misma tendencia del análisis de componentes de los materiales verdes, donde las familias $F_{2,3}$ se agruparon sobre la derecha del gráfico, debido a los mayores valores en los caracteres productivos en comparación a ambas Rils. Sin embargo, entre las Rils se observa una distribución similar de la variabilidad, y cuando las comparamos

con las familias $F_{2,3}$ a pesar de ubicarse en posiciones diferentes del gráfico, la distribución entre los miembros de la misma población resulta ser similares.

Con el objetivo de realizar un análisis más riguroso de la variabilidad presente se realizaron dos diagramas de perfiles multivariados. Este análisis nos permite graficar la variabilidad con respecto a cada carácter evaluado, permitiendo realizar una mejor caracterización de las causas de la variabilidad.

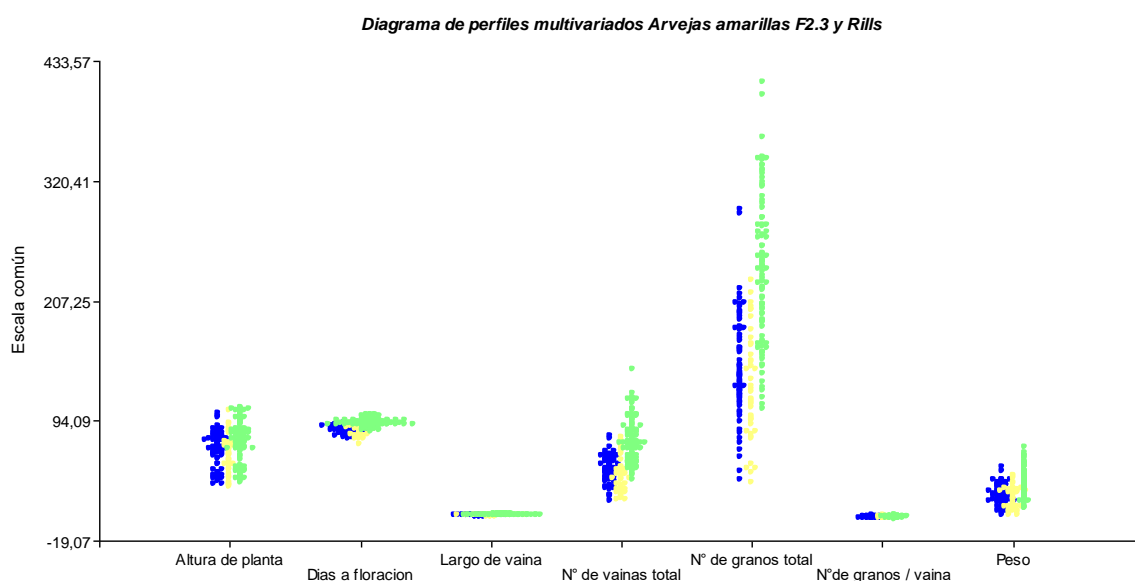


Gráfico 13: Diagrama de perfiles multivariados para las poblaciones de arveja amarilla. Los puntos verdes representan a las familias $F_{2,3}$, los puntos amarillos a las Rils obtenidas por el SSD a campo y los puntos azules por las Rils obtenidas por *Speed breeding*.

En el Gráfico 13 se observa el realizado sobre la población amarilla. A partir de este gráfico es posible observar que la variabilidad es similar para caracteres como altura de planta, número de vainas total y peso, sin embargo, en caracteres como días a floración, la variabilidad se vio reducida, lo que puede ser explicado por las variaciones climáticas y la pérdida de materiales durante los procesos de avance de materiales segregantes. Durante la campaña 2020, año en el que se sembraron las Rils, las temperaturas medias fueron mayores (fue el año más cálido de los últimos 50 años en Argentina) lo que pudo haber provocado el adelantamiento de la floración de las Rils. Esto puede observarse en el Gráfico 11, que demuestra que las Rils se agruparon sobre el margen izquierdo de la clasificación de los días

a floración. Con respecto a los demás caracteres como N° de granos total y N° de granos / vaina, si bien los valores de las Rils presentaron valores menores, la magnitud de la variabilidad (medida como el rango que comprende entre los extremos de los grupos dentro de cada carácter), no demostró disminuir considerablemente con respecto a las familias F_{2,3}. Con respecto a la comparación entre las Rils, se observa la misma tendencia de los análisis anteriores, que para cada variable analizada la distribución de la variabilidad es similar para ambos grupos de Rils, ya sea los obtenidos por *Speed breeding* como los obtenidos por el SSD a campo.

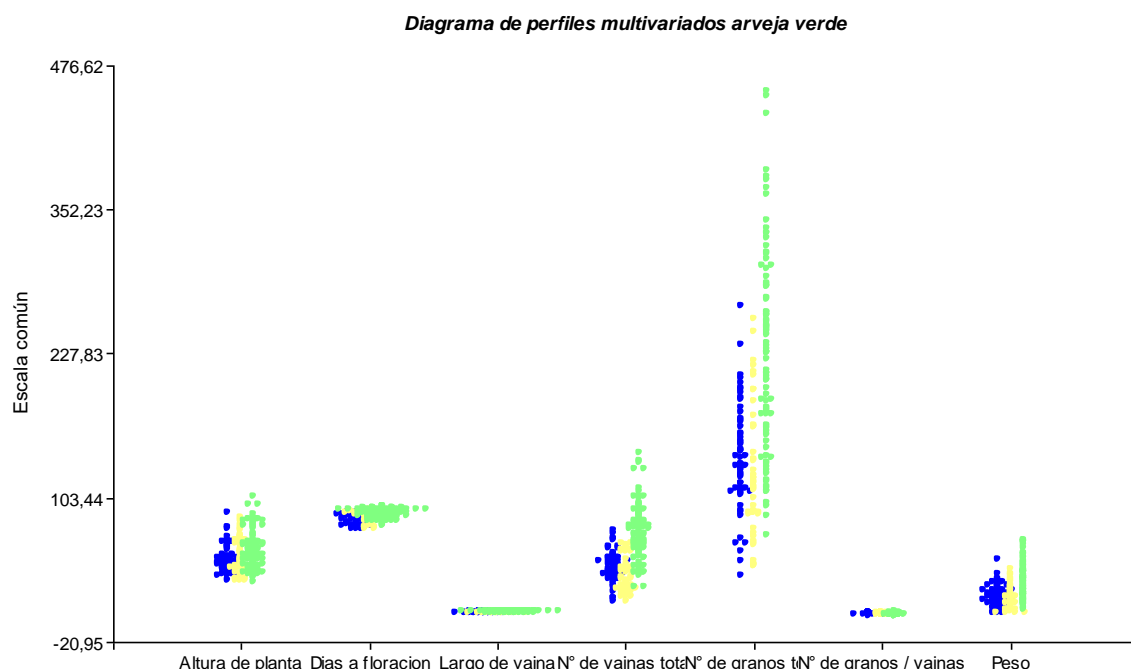


Gráfico 14: Diagrama de perfiles multivariados para las poblaciones de arveja verdes. Los puntos verdes representan a las familias F_{2,3}, los puntos azules a las Rils obtenidas por el SSD a campo y los puntos amarillos por las Rils obtenidas por *Speed breeding*.

En el Gráfico 14 se pueden observar la distribución de los perfiles multivariados para los diferentes caracteres en las poblaciones de arveja verdes. En los caracteres altura de planta, largo de vaina y peso, las distribuciones tendieron a ser similares, sin embargo, en días a floración se observó similares distribuciones a la presentada por las arvejas amarillas, donde los valores de las Rils se ubicaron sobre el margen izquierdo. En los caracteres N° de vainas totales, N° de granos totales y N° de granos / vainas, las distribuciones de las Rils resultaron

similares entre sí, sin embargo, cuando se compara con las familias $F_{2,3}$ la distribución de la variabilidad resulto ser marcadamente menor. Esto va en concordancia con los análisis realizados hasta acá tanto para las poblaciones de arveja amarilla como las de arveja verde, donde los valores de las Rils, ya sean obtenidas por los sistemas de *Speed breeding* como por el método SSD a campo presentan una distribución similar, sin embargo, cuando se las compara con las familias $F_{2,3}$ correspondientes, la variabilidad resulta ser menores por los motivos antes mencionados.

8.4.1 Análisis de Rils transgresivas

	Arvejas amarillas		Arvejas verdes	
	%T Rils SB	%T Rils SSD C	%T Rils SB	%T Rils SSD C
NV	24.4	50.0	33.3	45.7
NG	26.6	40.0	35.5	52.5
NG/V	31.1	24.3	57.7	50.8
P	8.9	8.6	20.0	25.4

Tabla 21: Porcentaje de individuos transgresivos para los diferentes caracteres en las diferentes poblaciones. %T Rils SB: porcentaje de individuos transgresivos para los diferentes caracteres de las Rils provenientes de *Speed breeding*. %T Rils SSD C: porcentaje de individuos transgresivos para los diferentes caracteres en las Rils provenientes del SSD a campo. Número de vainas por planta (NV); Número de granos por parcela (NG); Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de granos por parcela (P).

En la Tabla 21 se muestran los porcentajes de individuos transgresivos para las diferentes poblaciones de Rils. El mismo se calculó sobre las variables productivas, y a partir de esto podemos observar que la variable P fue la que demostró menores valores de porcentaje de individuos transgresivos. Por otra parte, las variables que dieron mayores valores, los cuales tomaron valores iguales o mayores al 50 % fueron NV en las Rils amarillas obtenidas por SSD a campo, NG/V en las Rils verdes obtenidas por *Speed breeding* y NG y NG/V de las Rils verdes obtenidas por SSD a campo.

8.4.2 Análisis de Conglomerados en las Rils

A partir del análisis de conglomerado realizado para las diferentes poblaciones, utilizando los diferentes caracteres analizados, se caracterizaron diferentes grupos y se seleccionaron diferentes Rils con características superiores:

Análisis de conglomerado utilizando Rils de arveja tipo verde obtenidas por SB

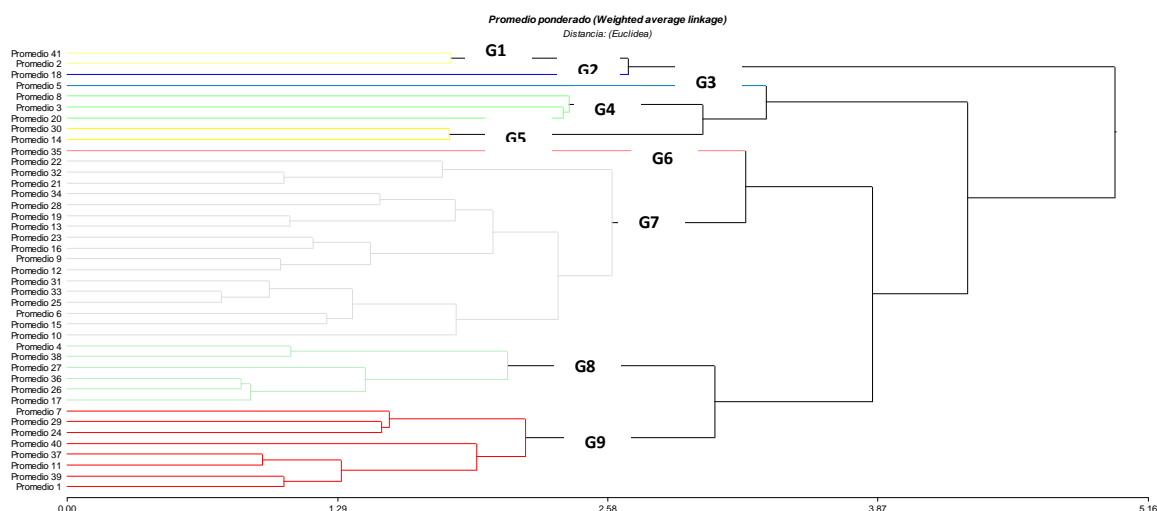


Gráfico 15: Dendrograma realizado a partir del análisis de clúster utilizando los diferentes caracteres cuantitativos evaluados en las Rils.

	GR ₁	GR ₂	GR ₃	GR ₄	GR ₅	GR ₆	GR ₇	GR ₈	GR ₉
AP	46.5 ^c	48.5 ^{bc}	75.7 ^a	78.7 ^a	51.6 ^b	43.5 ^c	79.0 ^a	62.2 ^b	40.7 ^c
DF	91 ^d	78.5 ^a	90.5 ^d	81.2 ^{ab}	90 ^{cd}	90 ^{cd}	83.5 ^{abc}	86.2 ^{bc}	78.9 ^a
NV	22.8 ^a	59 ^b	60 ^b	61.7 ^b	36.6 ^{ab}	25.5 ^a	46.5 ^{ab}	61.2 ^b	24.2 ^b
P	7.9 ^a	33.5 ^{bc}	39.2 ^c	25.3 ^{abc}	18.2 ^{ab}	18.5 ^{abc}	12 ^a	27.7 ^{abc}	11.7 ^a

Tabla 23: Altura de planta al momento de cosecha (AP); días a aparición de la primera flor (DF); número de vaina por parcela (NV); Peso total de grano por parcela (P). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$

A partir del análisis de clúster del grupo Rils de arvejas verdes obtenidas por SB, se obtuvieron 9 grupos diferentes. Sobre esos grupos el análisis de la varianza demostró diferencias significativas entre los grupos para los diferentes caracteres. A partir de estos análisis se seleccionaron los grupos 3, 4 y 8, debido a que reúnen las características para obtener

individuos superiores, dentro de estos grupos se encuentran las familias 2, 3, 4, 8, 17, 20, 26, 36, 38 y 41 de las Rils verdes obtenidas por SB.

Análisis de conglomerado correspondientes a las Rils de arveja tipo amarilla obtenidas por SB

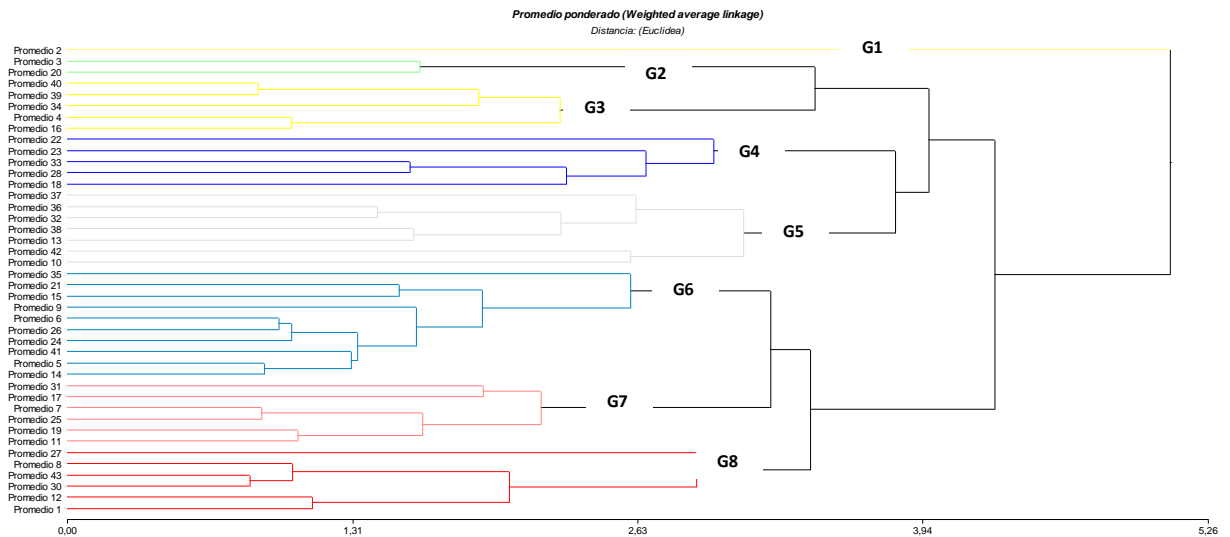


Gráfico 16: Dendrograma realizado a partir del análisis de clúster utilizando los diferentes caracteres cuantitativos evaluados en las Rils.

	GR ₁	GR ₂	GR ₃	GR ₄	GR ₅	GR ₆	GR ₇	GR ₈
AP	50.1 ^{ab}	68.7 ^{bc}	91.5 ^c	68.2 ^{bc}	76.2 ^{bc}	60.2 ^{abc}	68.6 ^{bc}	36.4 ^a
DF	86.2 ^{ab}	90.6 ^b	89 ^{ab}	80.7 ^{ab}	78.9 ^a	89.2 ^b	87.2 ^{ab}	82.2 ^{ab}
NV	24.4 ^a	45.3 ^{ab}	78.5 ^c	74.7 ^c	50.8 ^b	26.5 ^b	35.1 ^{ab}	49.5 ^b
P	7.9 ^a	30.1 ^c	27.5 ^c	28 ^c	32.2 ^c	13.6 ^{ab}	14.1 ^{ab}	26.6 ^{bc}

Tabla 24: Altura de planta al momento de cosecha (AP); días a aparición de la primera flor (DF); número de vaina por parcela (NV); Peso total de grano por parcela (P). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

Con respecto al análisis de clúster sobre las Rils provenientes de la población de arveja amarilla obtenidas por SB, el mismo se dividió en 8 grupos diferentes los cuales demostraron diferencias significativas para los diferentes caracteres a partir del análisis de varianza. Los grupos seleccionados a partir de estos análisis fueron los grupos 4 y 5, debido a que son los

grupos con el mayor peso total de granos y con una altura que es la adecuada para los materiales comerciales, el mismo está conformado por las Rils, 10, 13, 18, 22, 23, 32, 33, 36, 37, 38 y 42.

Análisis de conglomerado correspondiente a las Rils arvejas tipo verdes obtenidas por SSD a campo

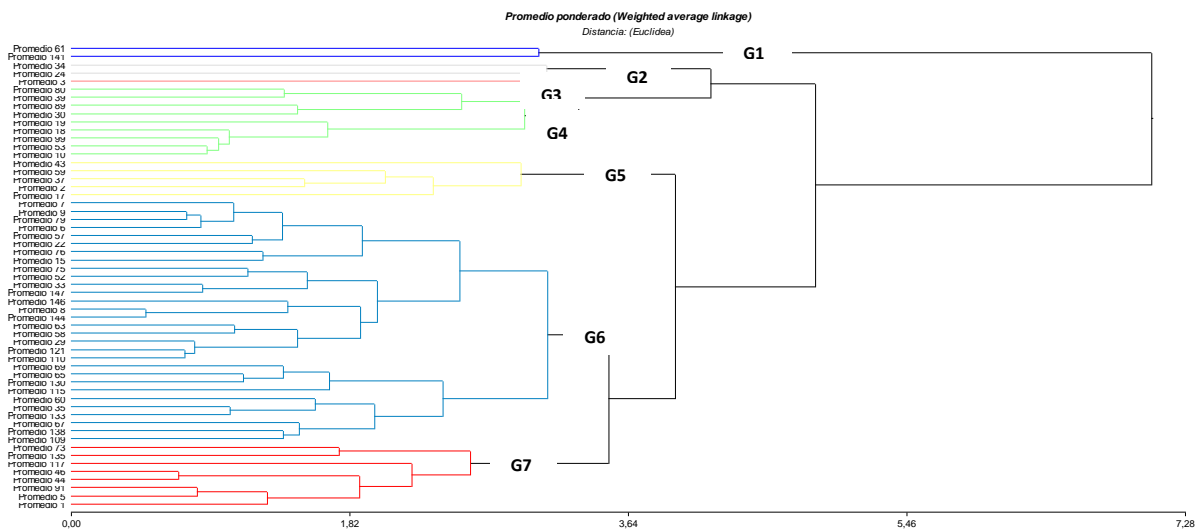


Gráfico 17: Dendrograma realizado a partir del análisis de clúster utilizando los diferentes caracteres cuantitativos evaluados en las Rils.

	GR ₁	GR ₂	GR ₃	GR ₄	GR ₅	GR ₆	GR ₇
AP	67.2 ^c	59.0 ^{bc}	44.4 ^{ab}	46.3 ^{ab}	71.7 ^c	31.5 ^a	46.9 ^{ab}
DF	87.7 ^{ab}	81.0 ^a	82.2 ^{ab}	88.0 ^{ab}	88.0 ^{ab}	91.0 ^b	82.5 ^{ab}
NV	46.8 ^{cd}	72.0 ^e	62.9 ^{de}	34.8 ^{bc}	16.2 ^{ab}	14.5 ^a	42.1 ^c
P	20.3 ^{bc}	43.5 ^d	24.5 ^c	12.6 ^{abc}	6 ^{ab}	4.5 ^a	21.1 ^{bc}

Tabla 25: Altura de planta al momento de cosecha (AP); días a aparición de la primera flor (DF); número de vaina por parcela (NV); Peso total de grano por parcela (P). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. p<0.05.

A partir del análisis de clúster realizado se formaron 7 grupos los cuales a partir del análisis de varianza realizado mostraron diferencias significativas para los diferentes caracteres. El

grupo que se seleccionó a partir de estos análisis es el grupo 2, conformado por las Rils 61 y 141.

Análisis de conglomerado utilizando las Rils de arvejas amarillas obtenidas por SSD a campo

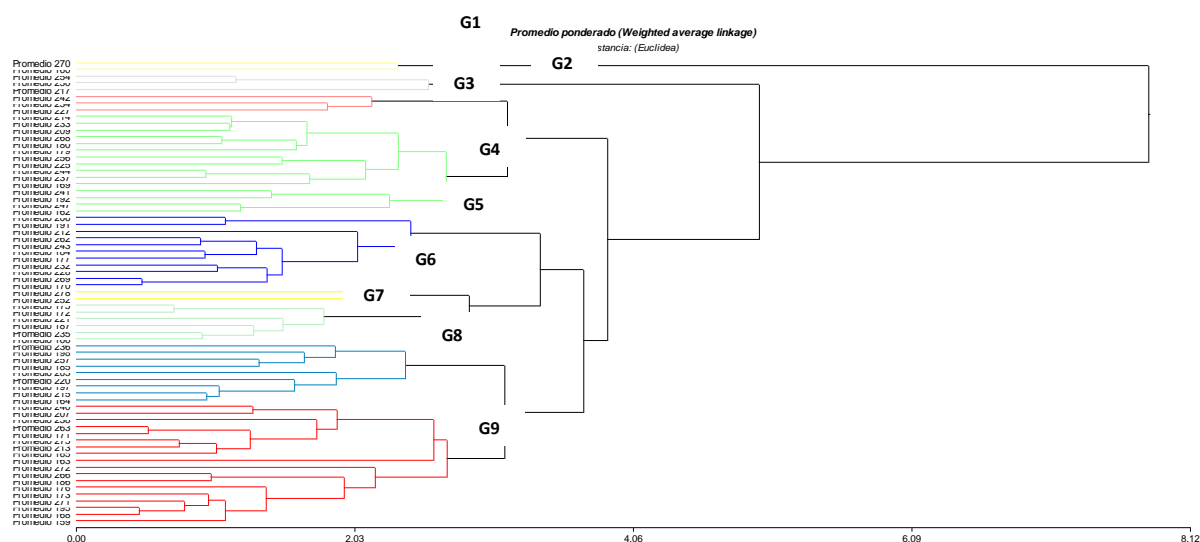


Gráfico 18: Dendrograma realizado a partir del análisis de clúster utilizando los diferentes caracteres cuantitativos evaluados en las Rils.

	GR ₁	GR ₂	GR ₃	GR ₄	GR ₅	GR ₆	GR ₇	GR ₈	GR ₉
AP	80.8 ^c	81.4 ^c	77.2 ^c	62.0 ^{abc}	58.6 ^{abc}	40.7 ^a	51.8 ^{ab}	49.0 ^{ab}	66.3 ^{bc}
DF	84.6 ^{abc}	81.2 ^a	84.2 ^{abc}	88.0 ^{abc}	90.4 ^c	88.2 ^{bc}	85.7 ^{abc}	81.7 ^{ab}	87.3 ^{abc}
NV	56.2 ^e	46.9 ^{cde}	78.0 ^f	39.0 ^{bc}	23.6 ^a	53.7 ^{de}	59.4 ^e	30.5 ^{ab}	40.8 ^{bcd}
P	31.1 ^{cd}	22.5 ^{bc}	48.7 ^e	16.2 ^b	7.0 ^a	28.8 ^{cd}	32.6 ^d	19.25 ^b	22.9 ^{bc}

Tabla 26: Altura de planta al momento de cosecha (AP); días a aparición de la primera flor (DF); número de vaina por parcela (NV); Peso total de grano por parcela (P). Letras diferentes en las medias indican diferencias significativas al 5 % de probabilidad. $p < 0.05$.

Se formaron 9 grupos diferentes a partir del análisis de clúster, los cuales presentan diferencias significativas para los caracteres evaluados. Luego de estos análisis se seleccionó el grupo 3, como el que posee los valores más promisorios, el mismo está formado por las Rils 160 y 270.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis se enmarca en el programa de Mejoramiento de Legumbres de la Cátedra de Mejoramiento Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario. El mismo tiene como objetivo evaluar diferentes metodologías de aceleración de generaciones en arveja y desarrollar un sistema que pueda incorporarse a los programas de mejora actuales, el cual ayudará enormemente a los mejoradores en el desarrollo de nuevo germoplasma y conferirán la capacidad de responder rápidamente a nuevas amenazas tanto bióticas como abióticas. Económicamente, esto podría conducir a aumentos sustanciales en el área de producción de arveja en Argentina, que podría destinarse tanto a consumo animal, como a consumo humano y a aumentar los saldos exportables actuales. Además, ayudaría a mejorar la sustentabilidad de los sistemas, incorporando una leguminosa durante el invierno, que no solo evite mantener los suelos desnudos, sino que también ayude a la fijación biológica de nitrógeno en los sistemas y evite una gran cantidad de aplicaciones de agroquímicos al suelo.

La arveja (*Pisum sativum* L.) es la tercera legumbre seca más cultivada en todo el mundo siendo una proteína interesante fuente para consumo humano y animal (Dahl et al., 2012; Guindon et al., 2021). A pesar de sus beneficios, su producción mundial ha aumentado marginalmente en los últimos 50 años al compararla con otros cultivos. Entre 1961 y 2012, los avances de la Revolución Verde llevaron a aumentos masivos en el rendimiento y producción de muchos alimentos básicos gracias a la industrialización de la agricultura. Durante este período, maíz, trigo, arroz y soja vieron aumentos de la producción acumulada de entre el 200 y 800 %, mientras que las legumbres sólo crecieron el 59 % (FAO, 2020).

El fitomejoramiento basado en métodos convencionales es un proceso lento. De hecho, el desarrollo de nuevas variedades de cultivos como la arveja necesita una década o más, utilizando metodologías tradicionales. El largo tiempo requerido para el desarrollo de nuevas variedades comerciales en especies autógamas, alentó a los científicos y criadores a encontrar formas más rápidas para obtener líneas puras (Lui et al., 2016). La modificación del

ambiente donde se desarrollan las plantas, como la temperatura y el fotoperiodo permiten un acortamiento en los ciclos de desarrollo, lo que es útil para acelerar los programas de mejora de arveja porque son los principales factores en la transición a la floración en leguminosas (Nelson et al., 2010). Al acelerar los procesos de mejoramiento, se puede mejorar más rápidamente la seguridad alimentaria evitando así impactos negativos de desnutrición en la población (Lenaerts et al., 2019). El creciente interés en las legumbres secas, hace que algunas especies como la arveja ingresen a los sistemas agroalimentarios convencionales en diferentes partes del mundo y, por lo tanto, requieran programas de mejoramiento más rentables capaces de responder rápidamente a los desafíos climáticos o de enfermedades (Pazos-Navarro et al., 2017).

El *shuttle breeding* o uso de contra-estación, los dobles haploides y el cultivo *in vitro* son algunas de las metodologías que se han desarrollado para acortar los tiempos de los programas de mejoramiento y así aumentar su eficiencia; sin embargo, ninguno de ellos se ha podido implementar de manera eficiente en los programas de arveja. Esta, como la mayoría de especies de legumbres, se ha descrito como recalcitrante en el cultivo de tejidos y en los enfoques biotecnológicos (Ochatt et al., 2000), incluido los dobles haploides (Croser et al., 2006; Dita et al., 2006, Gatti et al., 2016). Los protocolos de cultivo de tejidos desarrollados en arveja hasta la fecha son genotipo dependiente y, por lo tanto, no se aplican ampliamente, o son lentos e ineficientes (Ochatt et al., 2000; Sidhu y Davies., 2005; Croser et al., 2006).

Un inconveniente que suele estar asociado a la aplicación de las metodologías no convencionales *in vitro*, es la disminución de la variabilidad genética presente en las generaciones segregantes por pérdidas de plantas que no tienen la capacidad de florecer *in vitro* (si esta es la metodología a utilizar) o bien se pierden durante el proceso de rusticación (Surma et al., 2013), cuando se utiliza el rescate de embriones inmaduros en medios de cultivo *in vitro*. Es por ello de suma importancia para el mejorador utilizar métodos robustos que permitan mantener el máximo posible la variabilidad disponible en la generación F₂ hasta la obtención de las diferentes Rils, ya que la conservación de un conjunto de las mismas con

una alta variabilidad genética, permitiría afrontar la mayor vulnerabilidad a plagas y enfermedades, y los problemas de calidad asociados con la uniformidad genética del cultivo. Cualquiera sea el método utilizado para el desarrollo acelerado de variedades, permitirá a los fitomejoradores aumentar el número de generaciones por año calendario pudiendo mejorar considerablemente la eficiencia de los programas de mejora (Sysoeva et al., 2010).

El método SSD (*Single Seed Descent*) es una modificación del método masal y es utilizado por los mejoradores para fijar rápidamente genes en líneas. Al ser necesaria al menos una semilla para producir la próxima generación, las plantas se pueden cultivar en condiciones que aceleren la floración y la formación de semillas a pesar de que no fomenten un alto rendimiento. Es por esto, que esta metodología puede estar asociada con la aplicación de diferentes técnicas dando como resultado diferentes modificaciones del método, entre las cuales podemos encontrar: SSD *in vitro*, SSD *in vitro-in vivo* y SSD *in vivo*. Estas metodologías se evaluaron en el presente trabajo con el fin de determinar cuál de ellos es el más eficiente para ser incorporado al programa de mejora y liberar al mercado nuevas variedades adaptadas a las condiciones de la región que disminuyan los riesgos productivos, mejorando la sustentabilidad de los sistemas productivos.

Cuatro accesiones (Ilca 5115, Zavalla 15, Amarilla y Turf) fueron seleccionados para dar origen a las 2 poblaciones segregantes evaluadas (una de arveja amarilla y otra de arveja verde). Estas variedades se seleccionaron por diferir en su lugar de origen, como así también en sus caracteres morfo agronómicos (Tabla 1).

Estos materiales se sembraron a campo durante tres años diferentes (2017, 2018 y 2020) lo que permitió determinar sus características y la influencia del efecto del año de cultivo (ambiente). El análisis de varianza realizado para los caracteres morfológicos determinó que la mayoría, excepto NG/V en los parentales verdes y NG/V y LV en los parentales amarillos, difirieron significativamente entre sí (Tablas 2 y 3). En relación a los ambientes evaluados, el mismo ANDEVA demostró su influencia sobre la mayoría de los caracteres evaluados excepto para NG/V entre los parentales de arveja verde, estableciéndose además una marcada

interacción entre los genotipos y el ambiente de evaluación. A partir de los datos climáticos del lugar de la evaluación (Gráfico 3), podemos observar que el año 2020 (año en el que también se evaluaron las diferentes Rils) resultó ser un año no favorable para el cultivo de arveja, lo que quedó demostrado por la ocurrencia de valores promedios inferiores para todos los caracteres evaluados. Durante este año la variación en los caracteres evaluados se debió principalmente a la ocurrencia de heladas tardías severas durante los últimos días de septiembre y los primeros días de octubre, época de plena floración de los materiales, que provocaron el aborto de una gran cantidad de flores durante este periodo. Además, este año se caracterizó por temperaturas por encima de los promedios históricos y por una sequía muy marcada durante los meses de invierno, que más allá de que el ensayo contaba con riego complementario, afectó a los materiales. Esto puede explicar también el por qué los valores de altura de planta y días a floración del año 2020 fueron los menores en relación a los otros años en estudio. A pesar de la disminución manifestada se sigue poniendo en evidencia la existencia de un comportamiento diferencial entre los progenitores.

Dos poblaciones F_2 caracterizadas en su variabilidad constituyeron el material de partida para la evaluación y comparación, de la metodología SSD no convencional seleccionada con la alternativa convencional a campo, que sirvió también como control en las evaluaciones de las metodologías SSD modificadas. En esta caracterización, la población F_2 de arveja verde demostró valores superiores para los caracteres NGP, NV y DF, mientras que la población amarilla mostro valores superiores para los caracteres AP y LV. Los coeficientes de variación (CV) para los caracteres productivos y AP fueron mayores en la F_2 de arveja verde.

Para el análisis de los CV, se utilizó la clasificación propuesta por Kosev et al. (2012), como una forma de caracterizar la variabilidad. Los resultados dieron valores elevados para ambas poblaciones excepto para los caracteres DF y LV. Como otra forma de caracterizar a la variación generada en la población F_2 , el índice de transgresividad (IT) propuesto por Koide et al. (2019), mostro la aparición de segregantes transgresivos en la mayoría de los caracteres, sin embargo, los mayores valores de IT no siempre se tradujeron en un mayor %

de individuos transgresivos. Se encontraron valores altos de IT para NG en la población verde F_2 y para NV, NG y P en la población F_2 amarilla, que se atribuye a la pequeña pero significativa diferencia entre los valores obtenidos para los padres y para el amplio rango de valores para su respectivo F_2 (Tabla 7).

Cuando se analizó el porcentaje de individuos transgresivos (Tabla 7), todos los caracteres presentaron en mayor o menor medida segregantes transgresivos, siendo AP, NV, NGP y P para la población verde y NV, NGP, NG/V y P para la población amarilla los que demostraron mayores valores. La presencia de individuos transgresivos en las poblaciones segregantes demuestra la ampliación de la variabilidad genética en la población, la cual es requerida para llevar a cabo con éxito los procesos de selección de genotipos superiores. Con respecto al índice de transgresividad (IT), los valores elevados para los caracteres NG/V de la población F_2 verde y NV, NG/V y P en la población F_2 amarilla, fueron generados por la escasa diferencia entre los valores de los parentales, aunque las mismas sean significativas y al amplio rango de valor entre sus respectivas F_2 . Estos datos concuerdan con lo observado por Koide et al., (2019) en cruza entre variedades de arroz para el carácter días a floración. Sin embargo, no se puede generalizar para todos los caracteres ya que existen caracteres que exhiben un elevado IT y los padres discrepan significativamente entre sí (P y NV en la población amarilla) o elevado IT con padres similares entre sí (DF para la población verde y NG/V para ambas poblaciones). Estos datos ponen en evidencia la gran variabilidad de partida de ambas poblaciones F_2 demostrada no solo por los altos valores de CV sino también por la aparición de segregantes transgresivos en ambas poblaciones.

Con relación a las familias $F_{2,3}$, las de cotiledón amarillo presentaron valores promedios superiores para la mayoría de las variables y menores CV que las familias con color de cotiledón verde. Los valores correspondientes a los rangos en ambos tipos de familias fueron similares, siendo el límite inferior de NG y de NV mayores en la población amarilla que en las verdes. Los mayores valores de CV se encontraron en los caracteres NG, NV y P para ambas poblaciones, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Guindon et al., (2019), y

resulta de interés para su explotación en el programa de mejoramiento genético de arveja, ya que diversos trabajos han puesto de manifiesto la influencia directa de estos dos componentes en el rendimiento del cultivo (Togay et al., 2008; Espósito et al., 2009). Por otra parte, los valores de CV obtenidos son menores a los demostrados por Almirón, (2015), lo cual es razonable si se tiene en cuenta que dentro de dicho estudio se incluyeron tanto variedades cultivadas como silvestres pertenecientes a la colección de germoplasma de la especie.

La presencia de segregantes transgresivos se ha demostrado en especies como: trigo (*Triticum aestivum* L.) para rendimiento y componentes de rendimiento (Yadav et al., 1998); lenteja (*Lens culinaris* Medik.) para rendimiento de semillas por planta (Chahota et al., 2007); maní (*Arachis hypogaea* L.) para caracteres como, biomasa total, índice de cultivo, peso de brote, peso de la raíz, peso de la vaina madura y peso de grano por planta (Shreya et al., 2017); arroz (*Oriza sativa* L.) para días a floración (Koide et al., 2019); y gandul [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] para precocidad (Srivastava & Saxena, 2019). En arveja, Ubayasena et al., (2011) analizaron la segregación transgresiva para caracteres de calidad, mientras que Guindon et al., (2019) demostraron la presencia de segregantes transgresivos favorables para diferentes caracteres cuantitativos analizando la descendencia de un cruzamiento entre una variedad de cotiledones verdes y una amarilla. De acuerdo a Riesberg et al., 1999, se han ofrecido varias explicaciones para justificar la aparición de fenotipos transgresivos en poblaciones segregantes, los cuales incluyen: una alta tasa de mutación en híbridos, reducida estabilidad de desarrollo, no aditividad de los efectos alélicos entre loci o epistasis, sin aditividad de los efectos alélicos dentro de un locus o sobre la dominancia, desenmascaramiento de alelos recesivos raros que suelen ser heterocigotos en variedades parentales, variación del número de cromosomas, y acción complementaria de los alelos aditivos que están dispersos entre las líneas parentales. De Vicente et al., (1993) plantean que la causa propuesta con mayor frecuencia para la aparición de segregantes transgresivos es la acumulación de alelos complementarios en múltiples loci heredados de ambos progenitores. Por otra parte, Cubero et al., (2003) proponen que la obtención de individuos segregantes se produce cuando se

realiza el cruzamiento entre materiales parentales con valores similares para la variable bajo estudio y con diferentes genes que controlen el carácter en uno y otro, lo que permite que algunos de los individuos F_2 contengan nuevas combinaciones génicas con mayor o menor número de genes de efectos favorables que los progenitores. Según Kuczynska et al., (2007) y Shreya et al., (2017) los individuos transgresivos observados en la generación F_2 pueden ser altamente heterocigotos, pero podrá fijarse o mantenerse la heterosis si el vigor resulta de la acumulación de alelos dominantes. Reyes, (2019) destacó que los fenotipos transgresivos son el resultado de una complementación positiva o negativa de alelos aditivos, interacciones epistáticas de atributos parentales únicos, desenmascaramiento de alelos recesivos de un heterocigoto padre, o cualquier combinación de estos mecanismos

En ambas poblaciones F_2 verde y amarilla, se obtuvieron altos valores de heredabilidad en sentido amplio para la mayoría de los caracteres, mientras que los valores intermedios solo se encontraron para NG para la población F_2 verde y NV para la F_2 amarilla (Tabla 5). En las poblaciones $F_{2,3}$, valores altos se obtuvieron para la mayoría de los caracteres evaluados, excepto NG y LV en la población verde y para NG, P y LV en la población amarilla. Sing y Sing (2006) reportaron altos valores de heredabilidad para altura de planta, vaina por planta y rendimiento. Por su parte Georgieva et al. (2016) observaron en arveja, valores similares de 95 y 61% para granos por planta y rendimiento, respectivamente. Altos valores de heredabilidad indican que se podría lograr una ganancia rápida seleccionando diferentes rasgos ya que la presencia de varianza aditiva es alta, lo que demuestra la existencia de familias con diferentes valores reproductivos. Por lo tanto, estas estimaciones pueden ayudar a los investigadores a determinar estrategia apropiada para el mejoramiento de cultivos (Sharma et al., 2003).

En especies autógamas como la arveja, desde el cruzamiento entre las variedades parentales seleccionadas, son necesarias 4-6 generaciones de endocría para generar líneas genéticamente estables y poder así proceder a la evaluación de sus características agronómicas y su rendimiento.

Debido a que, teóricamente, minimiza los efectos de la selección natural, el método SSD retiene mayor variabilidad genética que otros esquemas de mejora. Muehlbauer et al., (1981) han establecido que la variancia genética aditiva presente en la generación F₆ en un esquema SSD es mayor que la que puede lograrse en el método masal ya que, en este último, existen pérdidas en la variabilidad genética durante el avance de generaciones. Además, como sólo se necesita una semilla para producir la próxima generación, el espacio necesario para llevar adelante esta metodología es más reducido que si se siguiese un método genealógico o de selección masal.

En el presente trabajo fueron analizadas tres metodologías de SSD modificados para acelerar generaciones en este cultivo y fueron evaluadas sobre diferentes variedades comerciales a fin de disminuir el efecto de la presencia de materiales segregantes y que los resultados pudiesen deberse principalmente a la metodología.

En todos los sistemas se trabajó con cámaras de cría con temperatura controlada mediante el uso de aire acondicionado frío-calor y sistema de luz provista por tubos fluorescentes T5 que fueron adecuados y de bajo costo como fue demostrado por Mobini y Warkentin (2016) quienes compararon el uso de tubos fluorescentes T5, LED, y lámparas de sodio de alta presión más halogenuros metálicos no habiendo diferencias entre los diferentes sistemas de iluminación en los días necesarios para inducir la floración en el cultivo de arveja. Sin embargo, los últimos avances en iluminación LED, permitirán que sea una tecnología que se puede incorporar a los programas de mejora, aumentando la eficiencia en el uso de la energía y disminuyendo costos (Watson et al., 2018; Idrissi et al., 2019). A pesar de esto, estas tecnologías de iluminación aún requieren una inversión inicial mayor comparada con el uso de tubos fluorescentes y por lo tanto aún no han sido incorporadas masivamente para llevar a cabo las diferentes evaluaciones. Con respecto a la altura de las plantas en la cámara de cría, fue necesario la utilización de flurprimidol para reducir el desarrollo de las plantas. Este compuesto produjo plantas compactas y más pequeñas que facilitaron el trabajo en la cámara

de cría. La altura de las plantas no superó los 30 cm. Datos similares fueron obtenidos por Mobini y Ribalta et al., (2014) y Warkentin (2016).

Analizando las diferentes metodologías de acortamiento de generaciones el método completamente *in vitro* no mostró resultados alentadores (Tabla 6) ya que se obtuvieron muy pocas plantas con formación de flores, además de ser un método con un costo elevado y que solo puede ser llevado a cabo por personal altamente capacitado en cultivo *in vitro*. Franklin et al., (2000) y Ochatt et al., (2002) propusieron dos protocolos. Ambos protocolos fueron desarrollados para un número limitado de cultivares de floración temprana y ninguno de ellos menciona la eficacia del método. El conocimiento de la eficiencia es importante si el objetivo del método es utilizarlo sobre poblaciones segregantes para obtener nuevas Rils. Seguir un esquema SSD requiere la preservación del material a través de las generaciones de recombinación. Ribalta et al., (2014) reportaron un método de floración *in vitro*, usando medio MS y flurprimidol para controlar el tamaño de la planta. A pesar de informar para el ciclo completo una media de 50 días en variedades de ciclo corto y largo, con una eficiencia entre el 70 y el 90%, en algunos cultivares de ciclo largo sólo el 10% de las plantas florecieron después 90 días de cultivo. Debido a estas características y al hecho de ser considerada como recalcitrante para el cultivo *in vitro*, no es una tecnología factible para ser incorporada para acelerar generaciones en programas de mejoramiento convencionales de arveja.

El método *in vitro-in vivo* incluye una etapa *in vitro* en la que se cultivan embriones inmaduros en medios de cultivo para acortar el ciclo de la planta e incluye un período *in vivo* donde la planta termina su desarrollo. Se ha probado en arveja (Surma et al., 2013) así como en lenteja (Bermejo et al., 2016). Ribalta et al., (2017) evaluaron la eficiencia de rescate de embriones *in vitro* en diferentes etapas, demostrando que su extracción a los 18 DDP (días después de la polinización) fue superior. En nuestro caso, la extracción a los 18 DDP (método *in vitro-in vivo*) resultó en un ciclo promedio de 88 días para las variedades evaluadas. La metodología *in vitro-in vivo* comparada con sistema convencional a campo mostró resultados muy prometedores con respecto a la duración del ciclo. Esto se debe a la exposición de las plantas

a condiciones estimulan la floración temprana (22 horas de luz) y a la cosecha anticipada de los granos (18 días después de la polinización). Sin embargo, se ha observado un lento desarrollo de las plantas durante los primeros días de aclimatación el cual es un procedimiento indispensable cuando se traspasan plántulas sembradas *in vitro* a condiciones *in vivo*. Resultados similares fueron reportados por Surma et al., (2013), quienes observaron un crecimiento muy lento durante las primeras 3 semanas. Las plantas florecieron entre 1,5 y 2,5 meses después de la siembra *in vitro* y un 10% de las plantas se perdieron durante la aclimatación. Por otra parte, el costo involucrado en la técnica *in vitro* es considerable debido a requerir equipos específicos, medios de cultivos y mano de obra especializada (Ghosh et al., 2018) lo que aumentaría considerablemente los costos de los programas de mejora, debido a que es necesario trabajar con una gran cantidad de materiales segregantes.

El sistema completamente *in vivo*, que incluye un sistema hidropónico y la cosecha de las vainas en madurez fisiológica (24 DAP) mostró una duración promedio de 76 días por ciclo (Tabla 10). Mobini y Warkentin (2016) ya habían propuesto un sistema de aceleración de generaciones enteramente *in vivo* utilizando el rescate de embriones inmaduros a los 18 DAP y cultivándolos en vermiculita como sustrato, lo que disminuyó el costo de los medios de cultivo. Sin embargo, el método requiere trabajo extra para el rescate de embriones, con la desventaja que la germinación de los embriones es irregular, lo que no permite el correcto manejo de las poblaciones segregantes. A diferencia del método *in vitro-in vivo*, la duración del ciclo en este método fue inferior y la cosecha de las semillas a las 24 DAP permite guardar la semilla y empezar la próxima generación cuando ya todos los materiales de la generación anterior completaron su ciclo, permitiendo un manejo más adecuado de las diferentes generaciones. Al no tenerse que recurrir al rescate de embriones, se disminuyen los costos del programa de mejora (tantos económicos como de requerimiento de mano de obra). En este sentido, el Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IRRI), efectuó un análisis de costos donde se demostró que el costo de la obtención de líneas disminuyó desde cientos de dólares (aplicando la selección de *Pedigree*) a 0,74 dólares estadounidenses mediante el uso

de una técnica de generación rápida (SSD modificado) basada en la utilización invernadero (Collard et al., 2017). Debe recordarse que método de *Pedigree* tiene un requerimiento de tierra y mano de obra que incrementan sustancialmente los costos de cada línea generada.

Desde el punto de vista del mantenimiento de la variabilidad genética la cual es una de las características esenciales del método SSD, el método completamente *in vivo* fue el mejor en relación con la eficiencia del sistema para preservarla (Tabla 10) con valores superiores al resto de los métodos incluido el control a campo. Este sistema permitió obtener entre 4.5 y 5.2 generaciones por año comparado con el método convencional a campo que sólo permite una sola generación por año. Al ser una metodología simple y económica se convierte en la alternativa más factible de incorporar a un programa de mejora.

Teniendo en cuenta los resultados, esta metodología fue aplicada sobre dos poblaciones segregantes comparándose su eficiencia con la que se observó en el método SSD convencional, utilizado como control. La eficiencia del sistema tradicional a campo fue del 66% (Tabla 13) permitiendo la obtención de 129 líneas. Estos valores están en concordancia con los mencionados por Knauft et al., (1987) quienes observaron que en los programas de mejora de maní que utilizan SSD tradicional, el 70% de las plantas producen al menos una semilla. Si bien las bases teóricas del método SSD postulan el mantenimiento de la variabilidad de la generación F_2 hasta el logro de las líneas, esta eficiencia menor a la predicha, es debido a las tensiones abióticas y bióticas que están presentes durante el período de crecimiento de las plantas a campo. Mientras tanto, el método *in vivo* es un sistema de ambiente controlado por lo que la eficiencia fue mayor (76%) obteniéndose 88 líneas, lo que permite al mejorador una mayor flexibilidad en la generación de nuevos materiales mejorados. Resultados similares fueron obtenidos por O'Connor et al., (2013) que desarrollaron un sistema de reproducción rápida en maní con eficiencias entre 68 y 74% para diferentes poblaciones segregantes.

Saxena et al., (2019) sugirieron que la reproducción rápida podría conducir a la erosión de variabilidad genética útil. Sin embargo, nuestros datos demostraron que la eficiencia del *Speed breeding* (metodología *in vivo*) (76%) fue superior al SSD tradicional a campo (66%)

(Tabla 13). Un dato a tener en cuenta que la eficiencia del 76% fue obtenida sobre una población segregante con un alto porcentaje de plantas de hojas normales, que se adaptan en menor medida a este tipo de sistema que las variedades semi-áfilas. La arquitectura de las plantas de hojas normales, sumadas a la alta densidad (266 plantas por m²) utilizados en este sistema, causaron pérdidas de plantas debido al sombreado y la competencia entre sí. Estos hechos se vieron reflejados en la eficiencia del método cuando se evaluaron las diferentes variedades, siendo la variedad foliosa la que demostró eficiencias menores, las poblaciones segregantes mostraron valores intermedios y las variedades semi-áfilas los valores superiores (90%) (Tabla 10). Aunque esta eficiencia lograda fue adecuada, podría incrementarse cruzando parentales de variedades semi-áfilas produciendo poblaciones segregantes 100% con este tipo de hojas. Actualmente, las variedades semi-áfilas son las más utilizadas por mejoradores y productores de arveja debido a la menor incidencia de enfermedades y su porte erecto, lo que ocasiona menores pérdidas en cosecha.

Para verificar el mantenimiento de la variabilidad genética se analizaron y compararon las Rils obtenidas tanto por el método SSD convencional como las obtenidas por *Speed breeding*. Los valores promedios y los Coeficientes de Variación observados en las Rils obtenidas por ambos métodos y en ambos tipos de poblaciones (de arvejas con cotiledones amarillos como en las de arveja de cotiledón verde), (Tabla 14 y 15) mostraron valores similares entre sí lo que muestra que ambos métodos presentan la misma variabilidad y que estos valores son equivalentes a los obtenidos en las generaciones F₂ y F_{2.3}.

Al analizar el parámetro heredabilidad se observa que para las diferentes poblaciones de Rils provenientes del sistema SB (Tabla 20) muestran valores más elevados que los obtenidos en la generación F_{2.3} para todos los caracteres no siendo así en los valores obtenidos entre las Rils mediante el método tradicional de SSD a campo. Estos fueron mayores o menores dependiendo de la variable estudiada. Los elevados valores obtenidos en el sistema SB pueden deberse a que, al crecer en cámara de cría con ambiente controlado y favorable para el desarrollo del cultivo, se desarrollaron muchas Rils que probablemente no hubiesen

subsistido en el ambiente de campo. Esto permitió que se expandiera la variancia genética y por ende la heredabilidad. Hasta el momento ningún trabajo ha explorado esta área de investigación por lo que no existen citas que puedan avalar esta hipótesis.

En los gráficos de análisis de componentes principales (Gráficos 11 y 12) y en los diagramas de perfiles multivariados (Gráficos 13 y 14), es posible observar, que, tanto para las poblaciones de arveja amarilla como las poblaciones de arveja verde, las distribuciones de las diferentes Rils obtenidas por ambos métodos muestran distribuciones similares. Estos resultados avalan que el método de SB es muy válido para el desarrollo de nuevas variedades. No ocurre lo mismo cuando se comparan las distribuciones de las Rils con las distribuciones de las familias $F_{2,3}$. Esto se debió, como se mencionó anteriormente, y se caracterizó en el análisis de los materiales parentales, a las inferencias climáticas desfavorables ocurridas durante el periodo de cultivo de las Rils. Probablemente si las condiciones ambientales hubiesen sido similares, las distribuciones hubiesen coincidido.

El análisis de conglomerado realizado sobre las diferentes poblaciones de Rils, permitió diferenciar grupos con características superiores. Este análisis demostró ser una estrategia muy útil para caracterizar las poblaciones de Rils, las cuales podrían originar variedades comerciales superiores. En el caso de los materiales de color de cotiledón verde pudieron obtenerse nueve Rils con las características buscadas de ciclo, altura y rendimiento y en los materiales con coloración de cotiledón amarillo 11, todas provenientes del sistema de SB mientras que sólo cuatro (dos de cada color de cotiledón) se derivaron del SSD a campo. Esto genera una muy buena oportunidad para incorporar la tecnología de *Speed breeding* en los programas de mejora actuales. Esta metodología tiene además del potencial de reducir el tiempo necesario para desarrollar nuevos cultivares, aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento en comparación con los sistemas convencionales ya que puede iniciarse en cualquier momento del año generando una gran cantidad de materiales segregantes durante todo el período, en un área pequeña (Cobb et al., 2019).

Este nuevo sistema ha sido desarrollado para diversos cultivos. O'Connor et al., (2013) reportaron un protocolo SB para maní con el uso de temperatura controlada y luz continua para acelerar el desarrollo de la planta y disminuir los tiempos de un programa de mejoramiento bajo un esquema de conducción SSD. Llevaron a cabo cruza parentales cultivando las plantas F₁ en el campo utilizando posteriormente el sistema en cámara para llevar a cabo el proceso de endogamia de las generaciones F₂ a F₄ en un período de 12 meses.

En arveja, Mobini y Warkentin (2016) lograron hasta cinco generaciones en un año, con un sistema hidropónico acompañado de rescate de embriones *in vivo* (18 días después de la floración) utilizando vermiculita como sustrato y con la aplicación programada de fertilizante y de regulador de crecimiento vegetal (0.6µM flurprimidol). La intensidad de luz fue de 500µM m⁻² s⁻¹ logrado con bombillas fluorescentes T5. El fotoperíodo se ajustó 20/4 h claro / oscuro y un régimen de temperatura de 21°C / 16°C luz/oscuridad.

En arroz, Collard et al., (2017) utilizaron un sistema de invernadero con el uso de bandejas de plántulas sembrando cuatro o cinco semillas por celda para asegurar una tasa de germinación del 95-100% y un posterior raleo a una planta por celda a los 10 o 14 días después de la siembra (DDS). La cosecha se efectuaba alrededor de los 90 DDS dependiendo de la población, y completándose la misma entre 95-105 DDS. Una vez lograda la generación objetivo (F₅ o F₆), las panículas eran llevadas a campo para efectuar el incremento de semillas.

En lenteja (*Lens culinaris* Medik), Lulsdorf y Banniza (2018) desarrollaron un sistema con un fotoperíodo de 20 horas combinado con la germinación de semillas inmaduras y con un proceso de selección de plantas resistentes a la pudrición de la raíz provocada por *Aphanomyces* logrando seis generaciones por año. Por su parte, Idrissi et al., (2020) obtuvieron 3-4 generaciones por año de lenteja con un fotoperíodo de 22 hs en una cámara de crecimiento con lámparas fluorescentes.

Watson et al., (2018), en trigo y cebada, emplearon un invernadero de temperatura controlada con luz suplementaria seguido de cinco días de secado (35° C), un día de remojo de la semilla

(temperatura ambiente) y cuatro días de tratamiento de enfriamiento a 4 ° C. Dependiendo del cultivar o accesión, las plantas alcanzaron la antesis en 35-39 días en el caso del trigo (con la excepción de la variedad Chinese Spring) y 37-38 días en el cultivo de cebada.

En soja, Nagatoshi et al., (2018), obtuvieron cinco generaciones por año utilizando una cámara de crecimiento con lámparas fluorescentes ($220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel del dosel), 14 h de luz (30 ° C) / 10 h de oscuridad (25° C) y suplementación con dióxido de carbono (CO₂) a 400 ppm. Por su parte, Jähne et al., (2020) obtuvieron 5 generaciones por año, utilizando diferentes módulos de tecnología LED, cosecha temprana y fotoperiodo de 10 horas.

Samineni et al., (2019) en garbanzo (*Cicer arietinum L.*) desarrollaron un protocolo de *Speed breeding* en seis accesiones de diferentes grupos de madurez (temprana, media y tardía) en condiciones de invernadero con luz artificial y sin agregado de reguladores de crecimiento. Este protocolo requirió de un invernadero de temperatura controlada, humedad e iluminación suministrada por lámparas funcionales de alta presión para extender el fotoperiodo a 22 horas e inducir así la floración temprana. Para reducir aún más el tiempo del ciclo generacional procedió a germinar las semillas inmaduras (entre 20 y 23 días después de la floración). El número promedio de generaciones logradas por año fue entre 6 y 7.

También en guandu (*Cajanus cajan L.*), Saxena et al., (2019) utilizaron un invernadero con luz natural y enfriadores de aire por evaporación que permitieron cuatro generaciones de semilla a semilla en un año. Por su parte, Mobini et al., (2020) en haba (*Vicia faba L.*) evaluaron diferentes tratamientos con el objeto de acortar los tiempos de cada generación. Examinaron el modo y el tiempo de aplicación exógena de 6-bencilaminopurina (BAP) (citoquinina) y los tratamientos de frío y sus combinaciones en dos genotipos. La aplicación de 10^{-5} M BAP 4 días después de la floración fomentó la formación de semillas en los nudos inferiores. El tratamiento con frío (8/4 °C día/noche durante 2 días) después del inicio de la floración indujo la formación de más vainas y un formado más rápido de las vainas en comparación con el tratamiento sin frío. El tiempo hasta la primera semilla se redujo significativamente y la viabilidad del polen aumentó en las plantas expuestas al tratamiento con frío.

Para rasgos genéticamente bien definidos, SB podría usarse para introducir rápidamente genes o haplotipos en líneas de élite mediante la selección asistida por marcadores (Hickey et al., 2017) permitiendo también estos protocolos el uso de métodos de mejora como la selección genómica (O'Connor et al., 2013; Li et al., 2018; Jighly et al., 2019). Esta metodología puede, además, acelerar muchas actividades de investigación y *pre-breeding*, incluido el desarrollo de poblaciones de mapeo, fenotipado de rasgos de plantas adultas, *back-crossing* (retrocruzamiento) y piramidación de genes, estudios de mutantes y transformación (Watson et al., 2018). Se podrían también mejorar las técnicas de edición genómica por ejemplo CRISPR y su proteína asociada Cas9 (CRISPR/Cas9). Una vez obtenida por transgénesis la proteína Cas9, la planta podría ser cultivar en condiciones de SB en lugar de las condiciones habituales de invernadero (Ahmar et al., 2020).

A partir de los datos presentados en este trabajo de tesis, se propone un sistema integral de mejora de arveja utilizando la metodología descrita. Este esquema incluye hibridaciones en cámara de crecimiento, lo que permitirá, además de la realización de hibridaciones durante todo el año, lograr una mejor eficiencia en los cruzamientos ya que las condiciones ambientales en cámara de crecimiento son más favorables que las condiciones a que están sometidas las plantas a campo al evitar la presencia de elevadas temperaturas en el momento de la floración que provocan aborto de flores y la presencia de factores bióticos y abióticos. Al poderse repetir la siembra en forma continua se asegura la obtención de numerosas plantas F_1 . Las semillas F_1 se sembrarán en invernadero con dosis óptimas de fertilizante, para obtener tantas semillas F_2 como sea posible. Estas semillas F_2 se sembrarán en cámara de cría siguiendo la metodología anteriormente descrita. A continuación, se presenta un diagrama comparativo de la metodología SSD modificado (*Speed breeding*) y el SSD convencional.

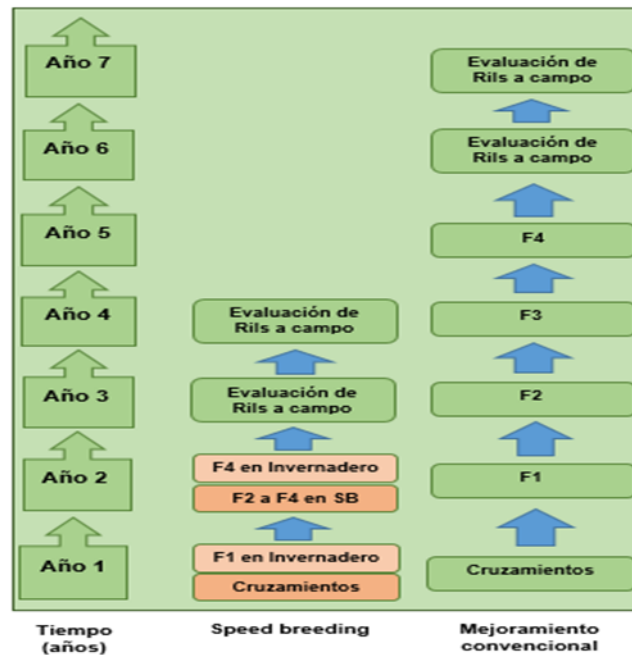


Figura 12: Comparación del tiempo requerido entre el sistema SSD convencional y el sistema de *Speed breeding* propuesto en arveja.

El sistema de *Speed breeding* requiere solo 2 años para obtener líneas estabilizadas en comparación con el sistema convencional que requiere 5 años. En ambos casos deberán realizarse las evaluaciones de las líneas obtenidas para efectuar la selección de las líneas élites. Este nuevo sistema reduce considerablemente el tiempo necesario para la obtención de variedades comerciales. El sistema propuesto aquí puede mejorar enormemente la eficiencia del programa, reduciendo el espacio de cultivo necesario (266 plantas m⁻²) y los costos asociados a los insumos y la mano de obra.

Para estimar los beneficios incrementales generados por los procesos de mejoramiento acelerados, Lenaerts et al., (2019) desarrolló una teoría novedosa y una metodología sencilla. Con esta metodología, por un tiempo de 2 años de reducción a una tasa de descuento del 5%, los beneficios de la aceleración de la reproducción son aproximadamente 10% más altos que los beneficios de la reproducción convencional. Para los programas de mejoramiento de mediana escala, una variedad comercialmente exitosa desarrollada a través del mejoramiento acelerado puede generar entre 1 y 10 millones de dólares en beneficios adicionales (Lenaerts et al., 2019). Lo más destacado de la velocidad del proceso de reproducción es que puede

reducir el tiempo de generación y acortar el ciclo de reproducción, lo que permite un rápido desarrollo poblaciones de mapeo y líneas estables, cribado para la identificación de fuentes de donantes para rasgo (s) y desarrollo más rápido de cultivares mejorados en cultivos (Watson et al., 2018). Los sistemas a campo también son más susceptibles a condiciones ambientales adversas durante el ciclo de crecimiento del cultivo, lo que puede provocar la pérdida de material, disminuyendo considerablemente la variabilidad en los programas. Para los programas de mejora de pequeña escala, el sistema de *Speed breeding* en invernadero ofrece una alternativa para el rápido avance del material de reproducción de la primera generación (O'Connor et al., 2013), permitiendo así una utilización de los recursos más eficiente. Siempre que el mejorador tuviera acceso a un invernadero o una cámara de crecimiento relativamente pequeñas y sea capaz de equiparla con luces convencionales o leds y algún sistema de refrigeración y/ calefacción, podría manejar un gran número de poblaciones segregantes para alcanzar rápidamente un nivel de endogamia equivalente a la lograda en un programa a campo. Por lo tanto, el mejorador podría llevar adelante los programas de mejoramiento con un uso más eficiente del espacio y la mano de obra.

Por otra parte, la energía necesaria para proporcionar una iluminación suplementaria es significativa. Más de la mitad del costo de los sistemas de *Speed breeding* se relaciona con la iluminación y el control de temperatura (O'Connor et al., 2013).

A medida que estos procedimientos sean incorporados en los diferentes programas de mejora, será posible desarrollar diversos protocolos para la obtención de materiales con diversas características, como resistencias a herbicidas, a enfermedades o adaptados a diversos ambientes.

10. CONCLUSIONES

- El proceso de hibridación y recombinación produjo una amplia variabilidad genética en las poblaciones F_2 de arveja amarilla y verde estudiadas, evidenciada por los altos valores de heredabilidad, los altos coeficientes de variación tanto de la generación F_2 como en las familias $F_{2:3}$ y la aparición de segregantes transgresivos para todos los caracteres.
- El método completamente *in vitro* no tuvo resultados prometedores, y por lo tanto no es un método factible de incorporar a los programas de mejora por su baja eficiencia y por sus costos elevados.
- El sistema *in vitro-in vivo* tuvo resultados prometedores sin embargo cuando se lo comparo con el sistema *in vivo* la duración de los ciclos fueron mayores mientras que las eficiencias fueron menores. Además, los costos son mayores al incorporar medios de cultivos para la técnica *in vitro*, lo que elevaría considerablemente los costos de los programas de mejora
- El método *in vivo* resulto ser el más eficiente y el de menor costo. Además, de poseer otras ventajas con respecto a los otros métodos, como por ejemplo, la posibilidad de sembrar las poblaciones segregantes en el mismo momento. Esto quiere decir que cuando se cosechan las vainas, las mismas se pueden guardar y sembrar el siguiente ciclo en el mismo momento (a diferencia del rescate de embriones *in vitro* que no permite esta pausa y los ciclos se realizan seguidos), lo que facilita su manejo y la posibilidad de pausar entre generaciones.
- La utilización de métodos SSD modificados permitió acelerar la obtención de Rils acortando ciclos generacionales
- Las variedades foliosas mostraron una baja adaptación a los métodos *in vitro-in vivo* e *in vivo*. Esto se debe a que en estos sistemas se utiliza un sistema

hidropónico de alta densidad de plantas (266 plantas/m²), lo que provoca una gran competencia entre plantas y como consecuencia una mayor pérdida de material. Sin embargo, en la actualidad tanto los productores como los mejoradores, utilizan variedades semiáfilas, las cuales por su estructura de planta se adaptan muy bien a estos métodos (con eficiencia mayor a 90 %).

- Al evaluar las Rils de ambas poblaciones (amarillas y verdes), tanto las obtenidas por el método convencional SSD a campo, como las obtenidas por el método *in vivo*, la variabilidad resulto ser similar, demostrando resultados alentadores para este método SSD modificado.
- Cuando se compara la variabilidad las Rils obtenidas por ambos métodos, con respecto a su correspondiente familia $F_{2,3}$, la misma resulto ser menor. Lo que puede deberse debido a las condiciones desfavorables ocurridas durante el año que se sembraron las Rils.
- El análisis de conglomerados permitió diferenciar grupos entre las Rils obtenidas por los diferentes métodos, y seleccionar materiales con características prometedoras. Esto, sumado a los altos valores de heredabilidad presentado por estos materiales, nos indican la alta potencialidad de estas selecciones.

11. BIBLIOGRAFIA

- Ahmar, S., Gill, R.A., Jung, K.H., Faheem, A., Qasim, M.U., Mubeen, M., Zhou, W. (2020). Conventional and molecular techniques from simple breeding to Speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. *International Journal of Molecular Science* 21, 2590.
- Alfonso, H. M. (2001). Enciclopedia Agropecuaria Terranova: Producción Agrícola 1. Bogotá.
- Alfonso, E., Leyva, A., Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 2, 47 -54.
- Ali, S.M., Sharma, B. & Ambrose, M.J. (1994) Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73, 115-126.
- Ambrose, M.J. (1995) From Near East center of origin, the prized pea migrates throughout the world. *Diversity* 11, 118-119.
- Annor, G. A., Ma, Z. & Boye, J. I. (2014). Crops – Legumes. *Food Processing: Principles and Applications*, 305-337.
- Araus JL, Kefauver SC, Zaman-Allah M, Olsen MS, Cairns JE (2018). Translating high-throughput phenotyping into genetic gain. *Trends Plant Sciences* 23, 451–466.
- Atlin, G.N., Cairns, J.E., Das, B. (2017) Rapid breeding and varietal replacement are critical to adaptation of cropping systems in the developing world to climate change. *Global Food Security* 12, 31–37.
- Bahrman, N., Le Gouis, J., Hariri, D. *et al.* (1999). Genetic diversity of old French six-rowed winter barley varieties assessed with molecular, biochemical and morphological markers and its relation to BaMMV resistance. *Heredity* 83, 568–574.
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., Robledo, C.W. (2008). *Infostat. Manual del Usuario*. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bermejo, C., Gatti, I., Cointry, E. (2016). In vitro embryo culture to shorten the breeding cycle

- in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127, 585–590.
- Bermejo, C., Guindon, M.F., Palacios, L.T., Cazzola, F., Gatti, I., Cointry, E. (2020). Comparative androgenetic competence of various species and genotypes within the genus *Pisum* L. *Plant cell, tissue, and organ culture* 143, 487-497.
- Brandan, E. Z. & Ploper, J. (1999). El cultivo de la arveja (*Pisum Sativum* L.). Ediciones del Rectorado U.N.T. Tucumán.
- Brim, C.A. (1966). A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science* 6, 220.
- Brummer, F.C., Barber, W.T., Collier, S.M., Cox, T.S., Johnson, R., Murray, S.C., Olsen, R.C. (2011) Plant breeding for harmony between agriculture and the environment. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9, 561–568.
- Cahaner, A., Hillel, J. (1980). Estimating heritability and genetic correlation between traits from generations F_2 and F_3 of self-fertilizing species: a comparison of three methods. *Theoretical and Applied Genetics* 58, 33-38.
- Chahal, G.S., Gosal, S.S. (2002). Principles and procedures of plant breeding: biotechnology and conventional approaches. *Alpha Science International*, 604.
- Cobb, J.N., Juma, R.U., Biswas, P.S., Arbelaez, J.D., Rutkoski, J., Atlin, G., Hagen, T., Quinn, M. & Ng, E. (2019) Enhancing the rate of genetic gain in public sector plant breeding programs: lessons from the breeder's equation. *Theoretical and Applied Genetics* 132, 627–645.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142, 169-196.
- Collard, B.C.Y., Beredo, J.C., Lenaerts, B., Mendoza, R., Santelices, R., Lopena, V., Verdeprado, H., Raghavan, C., Gregorio, G.B., Vial, L., Demont, M., Biswas, P.S., Iftekharuddaula, K.F., Rahman, K.A., Cobb, J.N., Rafiqul, I.M. (2017). Revisiting rice breeding methods: evaluating the use of rapid generation advance (RGA) for routine rice breeding. *Plant Production Science* 20, 337–352.

- Cousin, R. (1997) Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* 53, 111-130.
- Croser, J.S., Ulsdorf, M., Davies, P.A. et al. (2006). Toward doubled haploid production in the Fabaceae: progress, constraints, and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 139–157.
- Cubero, J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Madrid: Mundi-Prensa. 567.
- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *The British Journal of Nutrition* 108, S3-S10.
- Davies, D.R. (1976) Peas *Pisum sativum* (Leguminosae-Papilionoideae). *In Evolution of Crop Plants*, 294-296.
- De Bernardi, L. (2016). Informe de Arvejas (*Pisum sativum*). Subsecretaría de Mercados Agropecuarios.
- DeVicente, M. C. & Tanksley, S. D. (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics* 134, 585-596.
- Dagustu, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroglu, M. (2010). Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryo. *Helia* 33, 95-102.
- De La Fuente, G.N., Frei, U.K., Lübberstedt, T. (2013). Accelerating plant breeding. *Trends in Plant Science* 18, 667–672.
- Dixon, R. A. & Sumner, L. W. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology* 131, 878-885.
- Duc, G., Agrama, H., Bao, S., Berger, J., Bourion, V., De Ron, A.M., Gowda, C.L., Mikic, A., Millot, D., Singh, K.B. & Tullu, A. (2014). Breeding Annual Grain Legumes for Sustainable Agriculture: New Methods to Approach Complex Traits and Target New Cultivar Ideotypes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 381-411.
- Dumont, E., Fontaine, V., Vuylsteker, C., Sellier, H., Bodèle, S., Voedts, N., Devaux, R., Frise, M., Avia, K., Hilbert, J.L. & Bahrman, N. (2009). Association of sugar content QTL and PQL with physiological traits relevant to frost damage resistance in pea under field and

- controlled conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 118, 1561-1571.
- Eriksson, D., Kershen, D., Nepomuceno, A., Pogson, B.J., Prieto, H., Purnhagen, K., Smyth, S., Wesseler, S., Whelan, A. (2019). A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. *New Phytologist* 222, 1673-1684.
- Espósito, A., Milanesi, L., Martin, E., Cravero, V., Lopez Anido, F. & Cointry, E. (2007). Analysis Based on Morphological, Protein and SRAP Markers in Pea (*Pisum sativum* L). *International Journal of Plant Breeding* 1, 129-134.
- Espósito, M. A., Martin, E. A., Cravero, V. P., Liberatti, D., López Anido, F. S. & Cointry, E. L. (2009). Relationships among agronomic traits and seed yield in pea. *Journal of Basic and Applied Genetics* 20, 1-8.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. (1996) 'Introduction to quantitative genetics.' Harlow, UK.
- FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat. Available at: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.
- Forster, B., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12, 368–375.
- Fratini, R., Ruiz, M.L. (2006). Interspecific hybridization in the genus *Lens* applying in vitro embryo rescue. *Euphytica* 150, 271–280.
- Gatti, I., Espósito, M. A., Almirón, P., Cravero, V. P., Cointry, E. L. (2011). Diversity of pea (*Pisum sativum*) accessions based on morphological data for sustainable field pea breeding in Argentina. *Genetics and Molecular Research* 10, 3403-3410.
- Gatti, I., Guindon, F., Bermejo, C., Esposito, A., Cointry, E. (2016). In vitro tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: use and current status. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127, 543–559.
- Gebologlu, N., Bozmaz, S., Aydin, M., Cakmak, P. (2011). The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of*

Biotechnology 10, 4895-4900.

Gent, G. P. (1988). Pea Growing Handbook. Peterborough.

Germana, M.A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tissue Organ* 86, 131–146.

Germanà, M.A. (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104, 283–300.

Goldenberg, F. B. (1965). Afila, a New Mutation in Pea. Boletín de Genética. Instituto de Fitotecnia. Castelar, Argentina. 27-28.

Goulden, C.H. (1941). Problems in plant selection. In: Proceedings of the 7th international congress genetics 1039, 132–133.

Goulet, B.E., RODA, F., HOPKINS, R. (2017). Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant Physiology* 173, 65-78.

Govorov, L. I. (1937). Peas. Cultivated Flora of the USSR, 231-336.

Greenway, M.B., Phillips, I.C., Lloyd, M.N., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. In Vitro Cellular & Developmental Biology. *Plant* 48, 403-410.

Guindon, M.F., Martin, E., Cravero, V., Gali, K.K., Warkentin, T.D., Cointry, E. (2019). Linkage map development by GBS, SSR, and SRAP techniques and yield-related QTLs in pea. *Molecular Breeding* 39, 54.

Hickey, L.T., Germán, S.E., Pereyra, S.A., Diaz, J.E., Ziems, L.A., Fowler, R.A., Platz, G.J., Franckowiak, J.D., Dieters, M.J. (2017). Speed breeding for multiple disease resistance in barley. *Euphytica* 213, 64.

Hickey, L.T., Hafeez, A.N., Robinson, H., Jackson, S.A., Leal-Bertioli, S.C.M., Tester, M., Gao, C., Godwin, C.I., Hayes, B.J., Wulff, B.B.H. (2019). Breeding crops to feed 10 billion. *Nature Biotechnology* 37, 744-754.

Huang, X., Han, B. (2014). Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 531-551.

- Idrissi, O. (2020). Application of extended photoperiod in lentil: towards accelerated genetic gain in breeding for rapid improved variety development. *Moroccan Journal of Agricultural Sciences* 1, 14-19.
- Janzen, J. P., Brester, G. W., Smith, V. H., Hall, L. & Box, P. O. (2014). Dry Peas: Trends in Production, Trade, and Price. *Agricultural Marketing Policy Center*.
- Jighly, A., Lin, Z., Pembleton, L.W., Cogan, N., Spangenberg, G.C., Hayes, B.J., Daetwyler, H.D. (2019). Boosting genetic gain in allogamous crops via Speed breeding and genomic selection. *Frontiers in Plant Science* 10, 1364.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. (1997). Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytology* 137, 165-177.
- Khan, T.N., Croser, J.S. (2004) Pea: Overview. In *Encyclopedia of Grain Science*, 287-295
- Knauft, D.A., Norden, A.J., Gorbet, D.W. (1987) Peanut. *Principles of cultivar development* 2, 346-385.
- Koide, Y., Sakaguchi, S., Uchiyama, T., Ota, Y., Tezuka, A., Nagano, A.J., Ishiguro, S., Takamura, I., Kishima, Y. (2019). Genetic properties responsible for the transgressive segregation of days to heading in rice. *G3: Genes, Genomes, and Genetics* 9, 1655-1662.
- Kuczyńska, A., Surma, M., Kaczmarek, Z., Adamski, T. (2007). Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the frequency of transgression effects in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 126, 361-368.
- Lenaerts, B., Collard, B.C.Y., De Mey, Y., Demont, M. (2019) Global survey 5 data on rice breeders' characteristics and willingness to adopt alternative breeding methods. *Data in Brief* 23, 103782.
- Li, H., Rasheed, A., Hickey, L.T., He, Z. (2018). Fast-forwarding genetic gain. *Trends in Plant Science* 23, 184-186.
- Liu, H., Zwer, P., Wang, H., Liu, C., Lu, Z., Wang, Y., Yan, G. (2016) A fast generation cycling system for oat and triticale breeding. *Plant Breeding* 135, 574-579.

- Lulsdorf, M.M., Banniza, S. (2018). Rapid generation cycling of an F₂ population derived from a cross between *Lens culinaris* Medik. And *Lens ervoides* (Brign.) Grande after aphanomyces root rot selection. *Plant Breeding* 137, 486-491.
- Lynch, M., Walsh, B. (1998) Genetics and analysis of quantitative characters. Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA.
- Mahmud, I., Kramer, H.H. (1951) Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. *Agronomy Journal* 43, 605-609.
- Mallu, T.S., Mwangi, S.G., Nyende, A.B., Ganga Rao, N.V.P.R., Odeny, D.A., Rathore, A., Kumar, A. (2014). Assessment of genetic variation and heritability of agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 5, 76-88.
- Mariotti, J.A., Collavino, N.G. (2014). Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. *Editorial: Orientación Gráfica, Buenos Aires, Argentina. 326p*
- Maskus, H. (2010). Pulse Processing, Functionality and Application. University of Winnipeg, Manitoba.
- McPhee, K. (2003). Dry pea production and breeding - A mini review. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1, 64-66.
- McPhee, K. E., Inglis, D. A., Gundersen, B. & Coyne, C. J. (2012). Mapping QTL for Fusarium wilt Race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum*). *Plant Breeding* 131, 300-306.
- Mobini, S.H., Warkentin, T.D. (2016). A simple and efficient method of in vivo rapid generation technology in pea (*Pisum sativum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 52, 530–536.
- Mobini, S., Khazaei, H., Warkentin, T.D., Vandenberg, A. (2020). Shortening the generation cycle in faba bean (*Vicia faba*) by application of cytokinin and cold stress to assist Speed breeding. *Plant Breeding* 139, 1181-1189.
- Muehlbauer, F.J., Short R.W., Summerfield, R.J., Morrison, H.J., Swan, D.G. (1981). Description and culture of lentils. Cooperative Extension, College of Agriculture,

Washington State University and USDA-ARS.

- Mishra, R. K., Chaudhary, S., Kumar, A. & Kumar, S. (2009). Effects of MULTIFOLIATE-PINNA, AFILA, TENDRIL-LESS and UNIFOLIATA genes on leafblade architecture in *Pisum sativum*. *Planta* 230, 177-190.
- Nagatoshi, Y., Fujita, Y. (2019). Accelerating soybean breeding in a CO₂-supplemented growth chamber. *Plant & Cell Physiology* 60, 77–84.
- Nelson, G.C., Rosegrant, M., Palazzo, A., Gray, I., Ingersoll, C., Robertson, R., Tokgoz, S., Zhu, T., Sulser, T., Ringler, C., Msangi, S., You, L. (2010) Food security, farming, and climate change to 2050: Scenarios, results, policy options. International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington, DC.
- Nemecek, T., von Richthofen, J. S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R. & Pahl, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28, 380-393.
- Ochatt, S.J., Sangwan, R.S., Marget, P., Ndong, Y.A., Rancillac, M., Perney, P., Röbbelen, G. (2002). New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumes. *Plant Breeding* 121, 436-440.
- Ochatt, S.J., Sangwan, R.S. (2010) In vitro flowering and seed set: acceleration of generation cycles. *Plant cell culture: essential methods* 97–110.
- O'Connor, D.J., Wright, G.C., Dieters, M.J., George, D.L., Hunter, M.N., Tatnell, J.R., Fleischfresser, D.B. (2013). Development and application of Speed breeding technologies in a commercial peanut breeding program. *Peanut Science* 40, 107–111.
- Pratap, A., Choudhary, A.K., Kumar, J. (2010). In vitro techniques towards genetic enhancement of food legumes: a review. *Indian Journal of Pulses Research* 23, 169-185.
- Pratap, A., Prajapati, U., Singh, C.M., Gupta, S., Rathore, M., Malviya, N., Tomar, R., Gupta, A.K., Tripathi, S., Singh, N.P. (2018) Potential, constraints and Speed breeding in pulses Crop & Pasture Science applications of in vitro methods in improving grain legumes.

Plant Breeding 137, 235–249.

- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: Effects on gibberellins biosynthesis and others metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 501–531.
- Redden, R.J., Chen, W., & Sharma, B. (2005). Chickpea Breeding and Management. United Kingdom: CABI.
- Rieseberg, L.H., Archer, M.A., Wayne, R.K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83, 363-372.
- Reyes, B.G. (2019). Genomic and epigenomic bases of transgressive segregation – new breeding paradigm for novel plant phenotypes. *Plant Science* 288, 110-213.
- Ribalta, F.M., Croser, J.S., Erskine, W., Finnegan, P.M., Lulsdorf, M.M., Ochatt, S.J. (2014). Antigibberellin-induced reduction of internode length favors in vitro flowering and seed-set in different pea genotypes. *Biologia Plantarum* 58, 39-46.
- Ribalta, F.M., Pazos-Navarro, M., Nelson, K., Edwards, K., Ross, J.J., Bennett, R.G., Munday, C., Erskine, W., Ochatt, S.J., Croser, J.S. (2017). Precocious floral initiation and identification of exact timing of embryo physiological maturity facilitate germination of immature seeds to truncate the lifecycle of pea. *Plant Growth Regulation* 81, 345-353.
- Samineni, S., Sen, M., Sajja, S.B., Gaur, P.M. (2020). Rapid generation advance (RGA) in chickpea to produce up to seven generations per year and enable Speed breeding. *The Crop Journal* 8, 164-169.
- Sarker, R.H., Das, S.K., Hoque, M.I. (2012). In vitro flowering and seed formation in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 48, 446-452.
- Sarikamiş, G., Yanmaz, R., Ermiş, S., Bakir, M. & Yüksel, C. (2010). Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 9, 591-600.
- Saxena, K.B., Saxena, R.K., Hickey, L.T., Varshney, R.K. (2019). Can a Speed breeding approach accelerate genetic gain in pigeonpea? *Euphytica* 215, 202.

- Schaefer, H., Hechenleitner, P., Santos-Guerra, A., Menezes de Sequeira, M., Pennington, R. T., Kenicer, G. & Carine, M. A. (2012). Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabaeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology* 12, 250-269.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591–611.
- Sharma, A.K., Singh, S.P., Sharma, M.K. (2003). Genetic variability, heritability and character association in pea (*Pisum sativum* L.). *Crop Research* 26, 135-139.
- Shreya, A., Vashanti, R.P. (2017). Transgressive segregation study in F3 population of four groundnut crosses. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 2054-2059.
- Sita, K., Sehgal, A., HanumanthaRao, B., Nair, R.M., Vara Prasad, P.V., Kumar, S., Gaur, P.M., Farooq, M., Siddique, K.H.M., Varshney, R.K., Nayyar, H. (2017) Food legumes and rising temperatures: effects, adaptive functional mechanisms specific to reproductive growth stage and strategies to improve heat tolerance. *Frontiers in Plant Science* 8, 1658.
- Smýkal, P., Horacek, J., Dostalova, R., Hybl, M. (2008). Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of Applied Genetics* 49, 155-66.
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J., Ellis, N.T. (2011). Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9, 4-18.
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C.J., Ellis, N.T., Flavell, A.J., Ford, R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P., McPhee, K.E. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* 2, 74-115.
- Smýkal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M.J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Greene, S.L., Nelson, M.N., Besharat, N., Vymyslický, T. (2015). Legume crops

- phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 43-104.
- Surma, M., Adamski, T., Swiecicki, W., Barzyk, P., Kaczmarek, Z., Kuczynska, A., Krystkowiak, K., Mikolajczak, K., Ogrodowicz, P. (2013). Preliminary results of in vitro culture of pea and lupin embryos for the reduction of generation cycles in single seed descent technique. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82, 231–236.
- Sysoeva, M. I., Markovskaya, E. F., Shibaeva, T. (2010). Plants under continuous light: review. *Plant Stress* 4, 5–17.
- Thomas, W.T.B., Forster, B.P., Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. *Doubled haploid production in crop plants, a manual* 337–349.
- Tiwari, G.; Lavanya, G.R. (2012). Genetic variability, character association and component analysis in F4 generation of fieldpea (*Pisum sativum* var. arvense L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 25, 173-175.
- Tukey, J.W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 5, 99-114.
- Upadhyaya, H.D., Dwivedi, S.L., Ambrose, M., Ellis, N., Berger, J., Smýkal, P., Debouck, D., Duc, G., Dumet, D., Flavell, A., Sharma, S.K. (2011). Legume genetic resources: Management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. *Euphytica* 180, 27-47.
- UPOV. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. (2009). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability: Pea: UPOV code: Pisum_SAT: *Pisum sativum* L.
- Varshney, R.K., Pandey, M.K., Bohra, A., Singh, V.H., Thudi, M., Saxena, R.K. (2019). Toward the sequence-based breeding in legumes in the post-genome sequencing era. *Theoretical and Applied Genetics* 132, 797–816.
- Warkentin, T.D., Smýkal, A.P.P., Coyne, C.J., Weeden, N., Domoney, C., Bing, D.J.,

- Leonforte, A., Xuxiao, Z., Dixit, G.P., Boros, L. & McPhee, K.E. (2015). Pea. Grain Legumes 37-46. Editorial Springer, Nueva York.
- Watson, A., Ghosh, S., Williams, M.J., Cuddy, W.S., Simmonds, J., Rey, M. D. et al. (2018). Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature Plants* 4, 23-29.
- Wedzony, M., Foster, B.P., Zur, I. et al. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Touraev, A., Foster, B.P., Jain, E.M. *Advances in haploid production in higher plants* 1-33.
- Winter, P., Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11, 438-448.
- Wroth, J.M. (1998). Possible role for wild genotypes of *Pisum* spp. to enhance ascochyta blight resistance in pea. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 469-479.
- [Www.support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/what-to-do-with-nonnormal-data/](http://www.support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/what-to-do-with-nonnormal-data/)
- Zohary, D., Hopf, M. (1973). Domestication of Pulses in the Old World. *Science* 182, 887-894

12. ANEXO

	AP	NV	NG	NG/V	LV	P
NV						
F ₂	0,1					
F _{2.3}	0,13					
Rils	0,1					
NG						
F ₂	0,11	0,88*				
F _{2.3}	0,21	0,81*				
Rils	0,11	0,83*				
NG/V						
F ₂	0,01	-0,01	0,41			
F _{2.3}	0,11	-0,04	0,37			
Rils	-0,02	-0,09	0,51			
LV						
F ₂	0,16	0,43	0,53	0,28		
F _{2.3}	0,21	0,36	0,48	0,29		
Rils	0,11	0,53	0,7*	0,34		
P						
F ₂	-0,01	0,84*	0,89*	0,25	0,54	
F _{2.3}	-0,04	0,81*	0,79*	0,28	0,49	
Rils	0,02	0,81*	0,92*	0,35	0,72*	
DF						
F ₂	0,29	-0,29	-0,21	0,11	-0,1	-0,37
F _{2.3}	0,32	-0,12	-0,01	0,23	-0,03	-0,21
Rils	0,14	-0,22	-0,13	0,1	-0,24	-0,19

Tabla 26: Tabla de coeficiente de correlación de Pearson. Poblaciones arveja verde. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV); Número de vaina por (NV). Número de granos (NG). Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de grano (P) y Días a aparición de la primera flor (DF). * Correlación fenotípica significativa al 1%.

	AP	NV	NG	NG/V	LV	P
NV						
F2	0,22					
F2.3	0,19					
Rils	0,16					
NGP						
F2	0,15	0,79*				
F2.3	0,08	0,81*				
Rils	0,1	0,88*				
NG/V						
F2	-0,05	-0,03	0,45			
F2.3	-0,04	0,05	0,38			
Rils	-0,07	0,18	0,6			
LV						
F2	0,25	0,3	0,39	0,21		
F2.3	0,21	0,33	0,28	0,24		
Rils	0,17	0,64	0,61*	0,35		
P						
F2	0,2	0,71*	0,84*	0,35	0,29	
F2.3	0,16	0,85*	0,89*	0,37	0,31	
Rils	0,13	0,88*	0,91*	0,45	0,7*	
DF						
F2	-0,04	-0,19	-0,14	0,04	0,13	-0,23
F2.3	-0,15	-0,12	-0,18	0,1	0,05	-0,18
Rils	-0,33	-0,26	-0,26	-0,18	-0,41	-0,27

Tabla 27: Tabla de coeficiente de correlación de Pearson. Poblaciones arveja amarilla. Altura de planta al momento de cosecha (AP); Largo de vaina (LV); Número de vaina por (NV). Número de granos (NG). Número de granos por vaina (NG/V); Peso total de grano (P) y Días a aparición de la primera flor (DF). * Correlación fenotípica significativa al 1%.