



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
Campo Experimental Villarino C.C. N° 14  
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina  
Tel/Fax: +54 0341 497-0080  
www.fcagr.unr.edu.ar  
agro@unr.edu.ar



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

**INTROGRESIÓN ACELERADA DE RESISTENCIA AL NEMÁTODO DEL  
QUISTE DE LA SOJA MEDIANTE RETROCRUZAMIENTO ASISTIDO  
POR MARCADORES DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE**

**MÓNICA GIUSTI**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL**

**DIRECTOR: Ing. Agr. Prof. Tit. ELIGIO N. MORANDI**

**CO- DIRECTOR: Ing. Agr. EZEQUIEL E. POZZO**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
Campo Experimental Vilema C.C. Nº 14  
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina  
Tel/Fax: +54 0341 497-0380  
www.fcagp.unr.edu.ar  
agro@unr.edu.ar

## **INTROGRESIÓN ACELERADA DE RESISTENCIA AL NEMÁTODO DEL QUISTE DE LA SOJA MEDIANTE RETROCRUZAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE**

**MÓNICA GIUSTI**

Ing. Agrónoma – Universidad Nacional de La Plata

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Asociados Don Mario, durante el período comprendido entre 2013-2015, bajo la dirección de Ing. Agr. Prof. Tit. ELIGIO N. MORANDI.

Nombre y firma del Maestrando:

Nombre y firma del Director:

Nombre y firma del Co – Director:

Defendida: .....de 20\_\_.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi co-director Ezequiel Pozzo por motivarme e impulsarme a realizar la Maestría y a mi director Eligio Morandi por la orientación y supervisión de la misma.

También quiero dar las gracias a mi equipo de trabajo en cría dentro del área de investigación de A.S. Don Mario quienes participaron de las tareas operativas necesarias para llevar adelante esta investigación poniendo especial empeño en el éxito de la misma.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de trabajo Ivana, Bibiana, Gaspar, Agustín entre otros, por participar en alguna instancia de este camino.

Y por último un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de principio a fin de mi familia y compañero incondicional Pablo.

A todos ellos, muchas gracias.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	III
INDICE GENERAL.....	IV
LISTADO DE FIGURAS.....	V
RESÚMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
A. CRUZAMIENTO INICIAL.....	14
B. PRIMERA RETROCRUZA (RC1).....	25
C. SEGUNDA RETROCRUZA (RC2).....	27
D. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F1).....	28
E. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F2).....	29
F. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO PRELIMINAR (EER).....	30
RESULTADOS.....	32
A. CRUZAMIENTO INICIAL.....	32
B. PRIMER RETROCRUZA (RC1).....	36
C. SEGUNDA RETROCRUZA (RC2).....	37
D. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F1).....	39
E. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F2).....	41
F. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO (EER) EN MICROPARCELAS.....	46
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXO 2.....	64

## LISTADO DE FIGURAS

### TABLAS

Tabla 1. Porcentajes del parental recurrente (PR) y donante (PD) en cada generación de retrocruza.....	8
Tabla 2. Características fenotípicas de las variedades recurrentes.....	15
Tabla 3. MM-SSR Satt309.....	18
Tabla 4. Cantidad de MM-SNPs polimórficos por cruza.....	33
Tabla 5. Resultados del fenotipado de los parentales .....	36
Tabla 6. Cantidad de F1 por cruza evaluada con y sin el gen de interés, <i>rhg1</i> .....	37
Tabla 7. Cantidad de MM-SNP polimórficos e individuos por generación.....	42
Tabla 8. Datos fenotípicos de individuos de alta similitud y ambos parentales, recipiente y donante .....	44
Tabla 9. Rendimientos promedio preliminares obtenidos en los ensayos de microparcels.....	47
Tabla.10. Cronología de la incorporación de resistencia a NQS a germoplasma elite de soja mediante selección asistida por MM.....	63
Tabla 11. Listado de los 550 MM-SNP utilizados para el genotipado de los genotipos.....	64

### FIGURAS

Figura 1. Población vs tierra cultivable.....	3
Figura 2. Esquema del Retrocruzamiento.....	7
Figura 3. Plantas identificadas con vinilo previo al muestreo .....	15
Figura 4. Sacabocado de 6mm para toma de muestra de hoja .....	16
Figura 5. Toma de muestra. Recolección de disco de hoja.....	16
Figura 6. Muestras en placa plástica de muestreo .....	16
Figura 7. Placa de muestreo debidamente tapada.....	16
Figura 8. Muestras en conservadora.....	16
Figura 9. Liofilizador.....	16
Figura 10. Pimpollo pelado, estigma visible.....	17
Figura 11. Pimpollo pelado polinizado .....	17

Figura 12. Extracción de ADN. Preparación de muestras en eppendorf.....	18
Figura 13. Extracción de ADN. Agregado de Kleargene.....	18
Figura 14. Termocicladores.....	19
Figura 15. Colocación de muestras en gel con pipeta.....	19
Figura 16. Primer plano de gel y muestras para la corrida.....	19
Figura 17. Lavado de raíces.....	21
Figura 18. Paso por tamices.....	21
Figura 19. Hembras de NQS en tamiz.....	21
Figura 20. Macerado de hembras de NQS.....	21
Figura 21. Tamices y cámara de recuento.....	22
Figura 22. Recuento de quistes en microscopio.....	22
Figura 23. Siembra en potes de semillas a ser testeadas.....	23
Figura 24. Inoculación.....	23
Figura 25. Vista de ensayo en invernáculo.....	24
Figura 26. Invernáculo Don Mario 1.....	25
Figura 27. Invernáculo Don Mario 2.....	25
Figura 28. Plántulas en invernáculo.....	26
Figura 29. Muestreo en invernáculo.....	26
Figura 30. Riego por goteo.....	26
Figura 31. Vista general.....	26
Figura 32. Resultado de ampliación para el marcador SSR Satt309 en gel de agarosa.....	32
Figura 33. Distribución de MM-SNPs en cromosomas para cada parental recurrente.....	34
Figura 34. Porcentaje de similitud por cruzamiento.....	35
Figura 35. Árbol representativo de la similitud entre recurrentes y el parental donante .....	35
Figura 36. Producto de ampliación en gel de agarosa para individuos F1 correspondientes a la cruce 502.....	36
Figura 37. Producto de ampliación para algunos individuos RC1F1 de la cruce 502.....	37
Figura 38. Similitud progenie RC1F1, de la cruce 502.....	38
Figura 39. Similitud progenie RC1F1, de la cruce 503.....	39
Figura 40. Similitud progenie RC2F1, de la cruce 502.....	40

Figura 41. Similitud progenie RC2F1, de la cruza 503.....	40
Figura 42. Similitud progenie RC2F2, de la cruza 502.....	41
Figura 43. Parentales Donante y Recurrente e individuos RC2F2.....	42
Figura 44. Reducción de germoplasma donante a través de las generaciones.....	43
Figura 45. Aumento de germoplasma recurrente a través de las generaciones.....	43
Figura 46. Grupo de 9 fotos. PD fuente de resistencia Hartwig, PR susceptible a NQS, progenie 97% similar al PR de donde se obtuvieron los individuos 99 y 100% similares al PR.....	45
Figura 47. Parentales Donante, Recurrente e individuo 100% similar al parental recurrente.....	46

## RESÚMEN

El Nemátodo del Quiste de la Soja (NQS), cuyo agente causal es *Heterodera glycines*, es una de las enfermedades más destructivas de la soja a nivel mundial. El uso de cultivares resistentes es la vía más efectiva y económica de controlar la enfermedad. El método de la retrocruza (RC) es el más empleado para la incorporación de genes de resistencia a germoplasma elite. Sin embargo, la necesidad de realizar al menos seis o siete generaciones para recuperar el genotipo del progenitor recurrente (PR) desalienta la utilización de esta técnica. La selección asistida por marcadores moleculares (SAM) contribuye a facilitar la recuperación del genoma del PR en un menor número de generaciones. El objetivo del presente estudio fue la recuperación rápida del genoma del PR utilizando la SAM en generaciones tempranas, en un programa de retrocruzas orientado a la incorporación de un locus de resistencia a *H. glycines*. Los parentales fueron evaluados con 550 marcadores de polimorfismo de nucleótido simples (SNP), uniformemente distribuidos en los 20 cromosomas de la soja. Los SNPs que resultaron polimórficos fueron luego usados para caracterizar las plantas segregantes en las generaciones RC1F1, RC2F1 y RC2F2. La SAM permitió identificar plantas 100% similares al PR, para el conjunto de los SNPs evaluados, en la generación RC2F2, para una de las cruzas evaluadas. La aplicación de la SAM permitió recuperar el genoma del PR en dos RC, reduciendo en dos tercios (i.e. de seis a dos) el número de RC necesarias para recuperar el genoma del PR, en un programa de mejoramiento orientado a la incorporación de resistencia al NQS en germoplasma elite de soja.

## ABSTRACT

The soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) is one of the most destructive soybean diseases worldwide. The use of resistant cultivars is the most effective and economical way to control the disease. The backcross (BC) is the most useful method to incorporate resistance genes to elite germplasm. However, the six to seven generations required for achieving the goal result in a low adoption of backcrossing. The marker-assisted selection (MAS) contributes to facilitate the recovery of the recurrent parent (RP) genome in few generations. The aim of this study was the recovery of the RP genome using MAS in early generations of a backcrossing program aimed to incorporate a resistance locus to *H. glycines*. The parental genotypes were evaluated with 550 single nucleotide polymorphism (SNP) markers, evenly distributed on the 20 soybean chromosomes. Polymorphic SNP were then used to characterize segregant plants in the BC1F1, BC2F1 and BC2F2 generations. By using SNP markers it was possible to identify the plants 100 % similar to the RP for the SNPs evaluated in the BC2F2 generation in one of the two crosses tested. The implementation of MAS in the backcrossing program allowed the recovery of the RP genome in two BC generations, reducing in two-thirds (i.e. from six to two) the time required for incorporating resistance to soybean cyst nematode to elite soybean germplasm.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la humanidad ha sido el cambio de una economía sustentada en la caza y la recolección de plantas a una basada en la agricultura (Cubero, 2000; Olazabal, 2014; Villarreal, 2008). Este arte del cultivo y explotación de la tierra, con el objetivo de obtener productos con fines humanos o con destino a los animales domésticos, ha generado diversas hipótesis que tratan de explicar las causas que impulsaron su desarrollo. La Teoría del Oasis, la Teoría del Área Nuclear y la Teoría de las Zonas Marginales han sido las más importantes. En todas ellas está impregnada la esencia del hombre por la evolución hacia la mejora de sus condiciones de vida (Krapovic, 2010; Osborn, 1993).

La agricultura como tal se inicia en el año 9000 a. C. y se convierte 3000 años después en la principal forma de obtener alimentos en diversas sociedades en todo el mundo. Esto permitió el crecimiento de las poblaciones, dada la mayor cantidad de alimento, y a su vez fue motivo de conquista de nuevos territorios en los cuales no se podía vivir anteriormente (Krapovic, 2005, Krapovic, 2010; Le Buanec, 2011).

Los primeros cultivos se domesticaron en medio oriente entre los años 9600 y 8500 a. C., siendo el trigo (*Triticum monoccocum* y *T. dicocum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) los primeros cereales en ser domesticados. En el 7500 a. C. aparecen los primeros indicios del cultivo de arroz (*Oriza sativa*) y soja (*Glycine max*) en China, país que logró ser el mayor productor y exportador de soja durante la primera mitad del siglo veinte (Diamond, 2002; Wysmierki, 2010).

La soja es una especie autógama de la familia de las leguminosas, considerada una de las más importantes, que puede crecer desde el ecuador hasta latitudes de más de 50°. Su importancia radica en su alto contenido de proteína (35-40%) y grasa (18-22%), con una alta proporción de ácidos grasos insaturados y de aminoácidos esenciales adecuados para la alimentación humana y animal (Ridner *et al.*, 2006; Saenz Perez *et al.*, 2007). En la campaña 2014/2015 el total de área cultivada de soja en el mundo fue de 117,81 millones de ha y el total de producción 319,36 millones de toneladas (Calzada, 2014; USDA, 2015).

En 1950 la producción de soja se desarrolló rápidamente en Estados Unidos, que pasó a ser el principal país productor y exportador de esta oleaginosa en el mundo y en 1970 Brasil se convirtió en el segundo productor y exportador de soja (Guriqbal, 2010).

Las primeras plantaciones de esta leguminosa en nuestro país datan de 1862, sin embargo hasta 1970 fue un cultivo casi experimental (Dougnac, 2004; Giorda y Baigorri, 1997; Olivero y Lopez, 2010). Actualmente la soja representa casi el 91% de la producción de semillas de oleaginosas y el 45% del total de granos producidos en Argentina, luego de haber exhibido un constante crecimiento a lo largo de las últimas tres décadas (Bergero, 2006). El avance de su producción resultó extraordinario debido fundamentalmente a que se adapta a un amplio rango de condiciones edáficas y climáticas, más allá de los beneficios económicos para los productores que la adoptan, llevando al país a ser el tercer productor y exportador a nivel mundial (Guriqbal, 2010). En la actualidad se mantiene en tercer lugar como productor detrás de Estados Unidos y Brasil, con una superficie sembrada de alrededor de 20 millones de hectáreas, ocupando un amplia zona ecológica que se extiende desde los 23° S a los 39° S, concentrándose principalmente en la región Pampeana Norte (Calzada, 2014; Cuniberti *et al.*, 2004; Giancola *et al.*, 2009; Olivero y Lopez, 2010).

Este rápido desarrollo ha estimulado muchas investigaciones sobre la fisiología, la genética y las características de la planta, por un lado, y sobre los aspectos agronómicos y su gestión e incorporación a los sistemas agrícolas, por otro. Todo esto bajo el sustento del mejoramiento genético, ciencia cuyo objetivo es modificar genotipos, mejorándolos con un fin determinado de acuerdo a las necesidades del hombre (Frankel, 1958). Una de las mayores contribuciones de los procesos de mejora genética ha sido la adaptación de variedades a nuevas áreas, lo que requiere ajustar el ciclo de crecimiento y los requerimientos del cultivo a las características de una nueva región. Otros aportes importantes han sido la mejora en características agronómicas, entre las que se destacan resistencia a enfermedades y plagas, y la tolerancia a condiciones ambientales adversas, entre las que se encuentran altas y bajas temperaturas y el déficit hídrico (Cornide, 2001).

Un programa de mejora de soja en la actualidad debe producir variedades con potencial y estabilidad de rendimiento superiores a las precedentes, satisfaciendo así las necesidades de los productores agropecuarios que son sus destinatarios primarios. Debido a que el incremento en la

demanda de alimentos a nivel mundial es permanente y que la superficie de suelos aptos para la agricultura no sólo es limitada sino que se va reduciendo a una tasa de 0,1% anual (Figura 1), la necesidad de producir más por unidad de superficie y con una mejor calidad es permanente (Faostat, 2011; Miralles, 2013). La creación constante de nuevos cultivares, que superen a los anteriores en la eficiencia en el uso de los recursos del ambiente (agua, radiación y nutrientes) para la producción de granos, con alta tolerancia o resistencia a la presión de agentes bióticos y abióticos adversos que tienden a deprimir los rendimientos constituye un gran reto para los fitomejoradores (Acquaah, 2009; Gurry, 2011).



**Figura 1.** Población vs Tierra cultivable

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes del cultivo de soja, afectando tanto el rendimiento como la calidad de la semilla. Las mismas dependen de las condiciones ambientales y se ven favorecidas por el monocultivo. A nivel mundial se calcula que las pérdidas promedio atribuibles a enfermedades oscilan entre 10 y 15 % (Distefano, 2003; Ivancovich, 2003; Wrather *et al.*, 2010)

Los nemátodos son conocidos por ser una importante limitación biótica para la producción en varios continentes del mundo. Se ha estimado que alrededor del 11% de la producción agrícola mundial se pierde como resultado del daño que estos parásitos causan en las plantas, lo que representa un tercio de todas las pérdidas atribuidas a plagas. Estos daños varían de insignificantes a la pérdida total de las cosechas. Existen cerca de 24 géneros y muchas especies asociados con la soja (Agrios, 2005; Singh, 2010).

El nemátodo más importante para el cultivo de soja a nivel mundial es el Nemátodo del Quiste, *Heterodera glycines Ichinohe* (NQS) (Wrather *et al.*, 2001). El mismo es de tamaño muy pequeño, no alcanza 0,5 mm, y vive en el suelo. El ciclo de vida varía entre 21 y 24 días, y consta de seis estadios: los huevos, cuatro estadios de larva y la forma adulta. El segundo estadio larval (J2) es la forma infectiva. La larva penetra la raíz, migra hasta una región cercana al cilindro vascular, donde después de varias transformaciones de las células vegetales y de la larva, se forma la estructura de alimentación del nemátodo (Davis *et al.*, 2000; Días, 2009; Klink *et al.*, 2013).

El género *Heterodera* se caracteriza por la formación de quistes correspondientes al cuerpo de la hembra adulta muerta, de color marrón, altamente resistente a condiciones adversas, que contiene en su interior un promedio de 500 huevos. La condición de parásitos de estos seres microscópicos hace que sean metabólicamente dependientes de un hospedador para continuar su ciclo de vida, sin embargo, los huevos en el interior de un quiste pueden sobrevivir un promedio de ocho años en ausencia de plantas hospedantes (Waldir, 2009).

Un nemátodo puede moverse a través del suelo sólo unos pocos centímetros al año con sus propias fuerzas. A pesar de esto, la infestación por nemátodos puede propagarse distancias sustanciales a través de otros medios. Cualquier cosa que pueda moverse por suelos infestados puede propagar la infestación, incluyendo maquinaria agrícola, vehículos y herramientas, viento, agua, animales y trabajadores agrícolas. Esta habilidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo y de rápida dispersión en estado de latencia, hace difícil su control y erradicación una vez establecido (Jones, 2013; Winter *et al.*, 2006).

Las condiciones que son favorables para el crecimiento de la soja lo son también para el desarrollo del nemátodo. El NQS es una importante plaga en suelos templados, siendo 27 °C su temperatura óptima de crecimiento. Su desarrollo se detiene en suelos con temperatura menor a 14 °C o superior a 34 °C. Este parásito toma importancia también en suelos arenosos bajo condiciones de sequía dada su capacidad de sobrevivir a condiciones adversas. La duración del ciclo de vida NQS está fuertemente influenciada por la temperatura y la humedad del suelo. Bajo temperaturas del suelo con promedios semanales entre 22 a 29 °C durante el período vegetativo de la soja, *H. glycines* alcanza la madurez en sólo tres semanas, pudiendo llevar a cabo varios ciclos de crecimiento durante el período total de este cultivo. Los niveles de pH del suelo también

influyen en los niveles de desarrollo de este parásito, suelos con niveles de pH de 7 a 8 tienden a tener mayores problemas de nemátodos en comparación con otras áreas cuyos suelos tengan niveles de pH que oscilen entre 5.9 y 6.5 (Riggs, 1982; Anand, 1995; Cabi, 2015).

La enfermedad causada por este parásito fue observada por primera vez en Japón en el año 1915, donde recibió el nombre de enanismo amarillo debido a los síntomas que causaba en las plantas infectadas. Posteriormente su presencia fue reportada en Corea, China, Europa, Egipto y Colombia en 1973 (Davis *et al.*, 2000). En los Estados Unidos de América este parásito fue observado por primera vez en 1954 (Riggs, 1988; Winter *et al.*, 2005), mientras que en Brasil el primer hallazgo fue en 1991/1992 (Waldir, 2009; Matsuo *et al.*, 2011). En Argentina, *H. glycines* fue detectado por primera vez en la campaña 1997/1998 en la región núcleo sojera (Baigorri *et al.*, 1998) y actualmente, se encuentra distribuido en todas las principales áreas productoras de soja (Doucet *et al.*, 2008). A fines de 1997 se detectó la presencia de NQS en las provincias de Santa Fe y Córdoba. Más tarde fue hallada su presencia en el Noroeste Argentino (NOA), en la campaña 1998/1999 (Costilla y Coronel, 1998; Gamundi *et al.*, 2001).

El nemátodo provoca alteraciones en las raíces de las plantas atacadas, afectando la normal absorción de agua y nutrientes, también puede llegar a producir enanismo severo y amarillamiento del follaje, lo que conlleva una reducción de los rendimientos y, en casos extremos, la muerte de la planta (Niblack, 2002). Se trata de una plaga que también puede reducir los rendimientos sin causar síntomas aéreos visibles, habiéndose determinado pérdidas del 20 al 30% en cultivos de aspecto normal (Gumandi, 2002; Wang *et al.*, 2003).

*H. glycines* es una especie con reproducción por anfimixia donde las hembras pueden ser fertilizadas por más de un macho. Esta es una de las causas de la alta variabilidad genética de la población del NQS (Matuso *et al.*, 2011).

Este parásito se caracteriza por contar con numerosas razas, en Brasil y EEUU fueron identificadas 10 y 12 razas del NQS, respectivamente. En la Argentina ya fueron encontradas las razas 1, 3, 5, 9 y 14. Actualmente se conocen 16 razas y de ellas la raza 3 es la más ampliamente distribuida, predominando a nivel mundial (Riggs, 1982; Santana, 2009; Shi *et al.*, 2015). A través del gran número de genes que le otorgan capacidad parásita y/o mediante recombinación genética, este nemátodo se adapta a una gama de huéspedes más amplia que la mayoría de las especies de nemátodos del quiste (Riggs, 1982). Sin embargo el número de hospedantes es

limitado, destacándose además de la soja (*Glycine max*), el poroto azuki (*Vigna angularis*), y el poroto común (*Phaseolus vulgaris*), aunque se ha confirmado que parasitan también otras plantas. La mayoría de las especies de cultivos como el maíz, el algodón, el girasol, el arroz, la caña de azúcar y el trigo son resistentes (Noel, 1993; Pedroso, 2008).

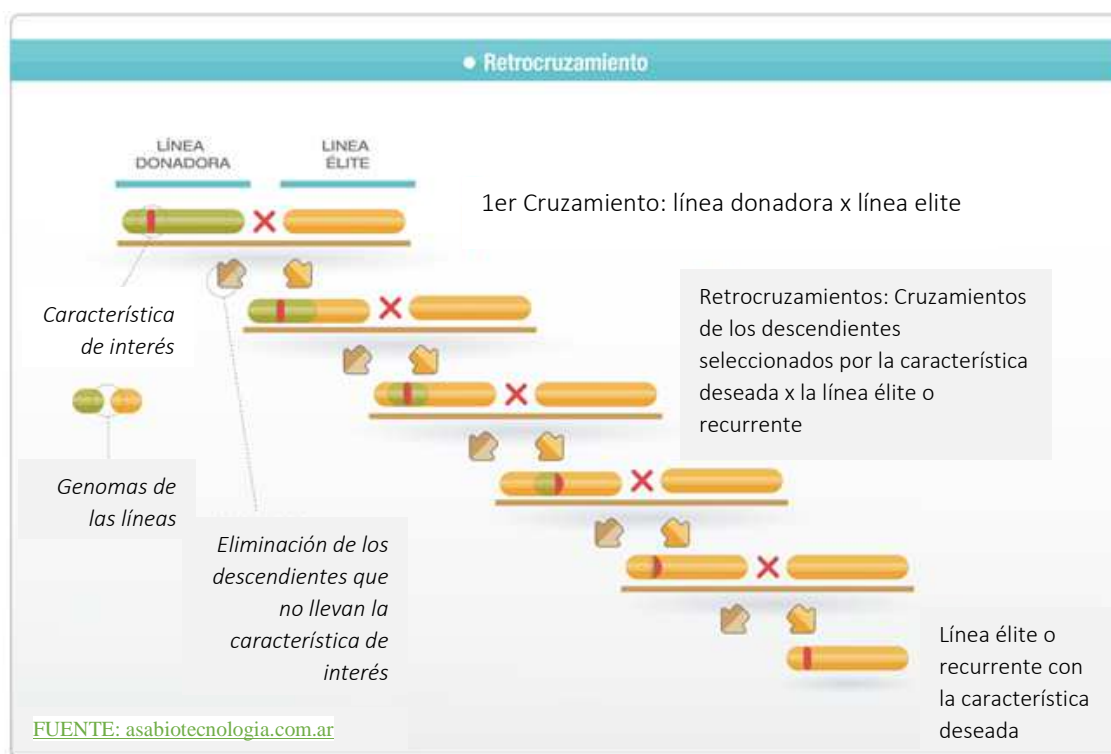
Existen diferentes tácticas de control que permiten reducir las pérdidas ocasionadas por este nemátodo, entre las que se pueden mencionar la rotación con cultivos no hospedantes, prácticas culturales tales como el uso de semilla de calidad, el monitoreo de los cultivos, la siembra directa que evita el movimiento de suelo y dispersión de los quistes entre otras, y el uso de variedades resistentes. Esta última alternativa se destaca por ser un método de control eficiente, económico y duradero, sumado a que no altera el ecosistema agrícola. Sin embargo, el uso repetido de un mismo cultivar resistente produce una presión de selección sobre la población del nemátodo, que puede derivar en una nueva raza, adaptada a ese cultivar, y al cabo de dos o tres campañas afectar seriamente los rendimientos (Niblack, 2005; Hershman, 2015)

Muchos germoplasmas resistentes han sido identificados y utilizados con éxito en programas de mejoramiento, entre ellos PI 88788, PI 437654, Peking, etc. Sin embargo, la base genética de cultivares de soja resistentes NQS es relativamente estrecha. Estudios moleculares realizados indican que la resistencia al NQS en cultivares comerciales argentinos deriva principalmente de PI 88788 y en menor medida de Peking, en pocos casos de PI 437654 o su derivado Hartwig (Guillin *et al.*, 2003).

Los genes de resistencia juegan un rol crítico en el desarrollo de cultivares resistentes. Usando métodos convencionales de análisis, varios genes de resistencia han sido caracterizados *rhg1*, *rhg2*, *rhg4*, entre otros, siendo uno de los más importantes el locus para resistencia parcial: *rhg1*, el cual explica más del 50% de la variación total de la resistencia y muestra un efectivo control a varias razas de NQS (Alzate-Marin *et al.*, 2005; Assunção *et al.*, 2004; Cregan, 1999; Ferreira, 2011; Matson and Williams, 1965; Ruben *et al.*, 2006). Este gen es común entre todas las fuentes de resistencia conocidas y fue identificado como un gen recesivo, co-dominante y hasta dominante en algunos casos dependiendo del alelo al que se refieran en cada uno (Afzali *et al.*, 2012a; Afzali *et al.*, 2012b). La PI 437654 posee el alelo 3, identificado como dominante, el cual le confiere resistencia a la raza 3 y participa de la resistencia frente a otras razas (Anand, 1985; Cervigni *et al.*, 2003; Rao-Arelli *et al.*, 1992). Este germoplasma introducido fue utilizado

para la obtención del cultivar Hartwig, resistente a la mayoría de las razas conocidas de NQS (Anand, 1992).

Una de las formas tradicionales utilizadas para la conversión de genotipos susceptibles a resistentes frente a enfermedades de importancia agronómica es el retrocruzamiento. En esta técnica, utilizada en los programas de mejoramiento genético vegetal, participan por un lado una variedad con algún gen de interés, que puede ser una variedad silvestre o mejorada, denominada “línea donante”, y por el otro, una variedad, generalmente una línea elite, de buenas características agronómicas que carece del mismo: “línea recurrente” (Figura 2). El objetivo que se persigue con este procedimiento es obtener lo más rápido posible un individuo que sea casi idéntico al parental recurrente pero que contenga el gen de interés del parental donante (Acquaah, 2007; Byrne, 2005; Cubero, 1999; Reyes-Valdes, 2000; Semang 2006; Sleper y Shannon, 2003).



**Figura 2.** Esquema del Retrocruzamiento.

Como la contribución del genoma del progenitor donante se reduce a la mitad con cada generación de retrocruzamiento, en la 6<sup>o</sup> generación de retrocruza se alcanza el 99,22 % de recuperación del genoma del parental recurrente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Porcentaje del parental recurrente (PR) y donante (PD) en cada generación de retrocruza.

GENERACIÓN	%PR	%PD
F1	50,00	50,00
RC <sub>1</sub>	75,00	25,00
RC <sub>2</sub>	87,50	12,50
RC <sub>3</sub>	93,75	6,25
RC <sub>4</sub>	96,87	3,13
RC <sub>5</sub>	98,44	1,56
RC <sub>6</sub>	99,22	0,78

El porcentaje de recuperación del parental recurrente (RPR) se puede calcular mediante la fórmula:

$$\text{RPR} = (1 - 0.5^{(n+1)}) * 100$$

Donde, n = número de retrocruzas.

En el tiempo que se tarda en incorporar una nueva característica mediante retrocruzas pueden desarrollarse nuevos cultivares que superen en rendimiento al progenitor recurrente con la característica introgresada. Esta es una de las principales causas de la baja adopción de este método de mejora, ya que el tiempo y esfuerzo utilizado en llevar a cabo las sucesivas retrocruzas se habrá desperdiciado si la variedad con el gen de interés obtenida ya no es competitiva en el mercado (Baenzieger *et al.*, 2005; Byrne *et al.*, 2005; Cubero, 1999; Reyes-Valdes, 2000; Robbins, 2012).

El tiempo requerido para alcanzar los objetivos buscados es esencial en el mejoramiento. En este sentido, la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) se incluye dentro del grupo de métodos que permiten reducir los tiempos totales de generación de nuevas variedades comerciales respecto del mejoramiento convencional (Sala *et al.*, 2010). Además, los marcadores moleculares representan una herramienta de gran precisión que pueden ser utilizados en la

determinación de la identidad de las variedades, especialmente en cultivos cuya base genética es estrecha, como la soja (Arnao *et al.*, 2010; Baenzieger *et al.*, 2005; Miroslav *et al.*, 2002; Olsina *et al.*, 2012).

Un marcador molecular es una secuencia de ADN que permite evidenciar la constitución física del genoma bajo estudio, funcionando como señalador de diferentes regiones del mismo. Esto quiere decir que se comporta como un punto de referencia en un cromosoma (forma estructural en la que se encuentra organizado el ADN en los organismos eucariotas) pudiendo o no corresponder a un gen (Martinez *et al.*, 2010). Mediante el uso de un marcador molecular se puede seguir una característica agronómica (fenotípica) sin que ésta se manifieste, siempre y cuando la secuencia de ADN en la que se basa el marcador esté físicamente cercana a un gen asociado al carácter agronómico en cuestión. A este proceso se lo denomina selección asistida por marcadores (SAM) (Guo-Liang, 2013; Sala *et al.*, 2010).

Distintos tipos de marcadores moleculares han sido utilizados para estudios de diversidad genética en soja, incluyendo proteínas e isoenzimas, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP), y más recientemente los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Cregan *et al.*, 1999; Guo-Liang, 2013; Keim, 1990; Lin *et al.*, 1996; Miroslav *et al.*, 2002).

Los SSR son regiones hiper-variables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tandem de mono, di, tri, tetra o penta nucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces. La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites radica en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y, consecuentemente, en el tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Por el alto polimorfismo que suelen presentar por locus (multiallelismo) se los considera los marcadores ideales para el mejoramiento en especies autógamas como la soja. Estos marcadores son co-dominantes (ambos alelos de un individuo heterocigota pueden ser visualizados), genoma-específicos y altamente polimórficos en comparación con los RFLPs y RAPDs (Buso *et al.*, 2003; Guo-Liang, 2013; Grupa *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2010). Dentro del genoma eucariota los microsatélites se encuentran distribuidos al azar con una frecuencia aproximada de uno cada 50.000 pares de bases. En el genoma de soja

estos se agrupan en conglomerados conocidos por poseer regiones ricas en genes (Song *et al.*, 2004).

Más recientemente han aparecido marcadores polimórficos en una sola base o SNP (por su sigla en inglés), los cuales han cobrado importancia debido a su abundancia en el genoma y a las tecnologías desarrolladas para su identificación (Grupa *et al.*, 2008). Los SNPs son la forma más sencilla y más común de polimorfismo genético ya que consisten en el cambio de un solo nucleótido en el contexto de una secuencia genética. Dichas variaciones pueden consistir en inserciones o deleciones que afectan a un único par de bases (comúnmente conocida como indels), también pueden darse sustituciones de un nucleótido por otro distinto. Los SNPs se han revelado como la mayor fuente de polimorfismo en el genoma humano (Collins *et al.*, 1998; Kruglyak, 1997; Kwok *et al.*, 1996), siguiendo esta misma tendencia en todos los organismos vivos (Ganal *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2003). Debido a su abundancia a lo largo del genoma, junto con la necesidad del desarrollo de marcadores de alto rendimiento, podría ser uno de los sistemas de identificación más usados en el futuro.

La posibilidad actual de desarrollar marcadores moleculares a partir de la secuencia de un número cada vez mayor de genes de interés agronómico (o secuencia cercana al gen) es una estrategia poderosa para el mejoramiento, ya que permite la selección indirecta en poblaciones segregantes de individuos portadores del carácter agronómico favorable. Esto nos da la posibilidad de independizarnos de la expresión del fenotipo, pudiéndose hacer uso de los mismos en estadio de plántula sin tener que esperar a que el carácter en cuestión se exprese, así como del ambiente, ya que los marcadores moleculares no son influenciados por los factores ambientales (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

La SAM no sustituye al mejoramiento vegetal tradicional sino que lo complementa y lo hace más eficiente. A su vez, dado que las incorporaciones de los caracteres de interés agronómico en la SAM se efectúan mediante cruzamientos convencionales no se generan controversias en la opinión pública como las que presentan los organismos transgénicos (Sala *et al.*, 2010).

Otro uso habitual de los marcadores moleculares en el mejoramiento es la caracterización e identificación de líneas avanzadas y líneas pertenecientes a bloques de cruzamientos respecto a

la presencia/ausencia de alelos de genes de valor agronómico. Esto permite realizar cruzamientos más específicos solamente con aquellos padres portadores del carácter de interés haciendo más eficiente el uso de recursos necesarios en cada generación (Sala *et al.*, 2010).

Como mencionamos anteriormente el retrocruzamiento, como método de mejora, tiene entre sus objetivos la introgresión de un gen correspondiente a una característica de interés. Si se cuenta con un marcador específico asociado a dicho gen, el avance generación tras generación, solamente con los individuos portadores del mismo, hará más eficiente el proceso total. Asimismo, si lográramos determinar dentro de esos individuos aquellos que presenten los mayores niveles de similitud con el parental recurrente, y utilizáramos ese grupo para obtener la siguiente generación, se lograría disminuir el número de generaciones necesarios para recuperar el trasfondo genético del parental recurrente (Bernardo *et al.*, 2006; Dubcovsky, 2004; Frisch *et al.*, 2001; Frisch *et al.*, 2005; Guo-Liang, 2013; Landau-Ellis *et al.*, 2009; Semagn *et al.*, 2006).

La asistencia con marcadores para recuperar el trasfondo genético del parental recurrente (MABS, por sus siglas en inglés) permitiría además introgresar más de un gen de interés, por ejemplo más de un gen de resistencia a una enfermedad, en la misma cantidad de años que se necesitan para introgresar sólo uno sin la asistencia de marcadores. De esta forma se podrían incorporar varios genes de resistencia a variedades elite, lo que ampliaría el espectro de resistencia de las mismas y/o les otorgaría la capacidad de mantenerse resistentes por más tiempo frente a cambios del patógeno (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

La utilización de la MABS ha sido investigada por varios autores utilizando la simulación (Hospital *et al.*, 1992; Visscher *et al.*, 1996; Frisch *et al.*, 1999 a y b). Hospital *et al.* (1992) predijeron un ahorro de dos generaciones de retrocruzamiento debido a MABS. Frisch *et al.* (1999b) demostraron que el número de generaciones de retrocruzamiento necesarias para la introgresión de un gen se redujeron en dos a cuatro generaciones. Frisch y Melchinger (2001) demostraron que un ahorro de tres generaciones de retrocruzamiento debido a MABS es una meta realista para la introgresión simultánea de dos genes. Asimismo existen trabajos publicados en los cuales se utilizó éste método de mejoramiento para diferentes cultivos, como el arroz, el trigo y el poroto común, entre otros (Arnao *et al.*, 2006; Faleiro *et al.*, 2004; Randhawa *et al.*, 2009). Sin embargo no se encontraron referencias sobre la aplicación de esta metodología en un programa

de mejoramiento orientado a la introgresión rápida (e.g. utilizando solo dos RC) de resistencia a NQS en germoplasma elite de soja.

## **HIPÓTESIS**

La utilización de marcadores moleculares (MM) aplicada al método de retrocruzamiento en soja permitirá disminuir sustancialmente el número de generaciones necesarias para alcanzar la recuperación del genoma del parental recurrente.

## **OBJETIVO GENERAL**

Utilizar el método de retrocruzamiento asistido por MM para maximizar la recuperación del genoma recurrente y posibilitar la introgresión rápida de un gen de interés en una variedad elite.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar molecularmente las variedades recurrentes y el genotipo donante, con el fin de identificar un mínimo de 20 MM polimórficos entre ellos.
- Introgresión en variedades elite de soja del gen *rhg1*, presente en una variedad pública, que confiere resistencia a *Heterodera glycines*, conocido como Nemátodo del Quiste de la Soja (NQS).
- Realizar dos generaciones de retrocruzamiento asistido molecularmente, utilizando un MM microsatélite (SSR, por sus siglas en inglés) asociado al gen *rhg1* y al menos 20 MM de polimorfismo de nucleótido simple (SNP, por sus sigla en inglés) distribuidos uniformemente en el genoma del parental recurrente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. CRUZAMIENTO INICIAL

#### A.1. Cruzamiento

El primer cruzamiento, Recurrente x Donante, correspondiente al verano 2012-2013, fue realizado en el campo de cría del semillero Don Mario S.A., en la ciudad de Chacabuco, Bs. As.

#### A.2. Descripción de la zona

La ciudad de Chacabuco es ciudad cabecera del partido de Chacabuco, y se ubica al norte de la provincia de Buenos Aires (latitud -34.6417, longitud de -60.4739). El clima es típico del centro de la región pampeana, templado húmedo, con veranos templados e inviernos frescos. Las precipitaciones anuales en Chacabuco alcanzaron un promedio de 950 mm en los últimos 30 años. El paisaje dominante es la llanura, cuyos suelos poseen alta fertilidad, que hacen de esta zona una de las principales del país en producción agrícola.

#### A.3. Germoplasma

**A.3.1. Donante:** Variedad Hartwig, de origen público, con presencia del locus *Rhg1* de resistencia a NQS, heredado de PI437654 (Diers *et al.*, 2010; Handoo, 1993; Young, 1999).

La misma es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado y grupo de madurez 4.5, tiene pubescencia gris, pared de fruto clara y flores púrpuras. Sus semillas tienen hilo negro imperfecto.

**A.3.2. Recurrente:** Diez variedades elite del programa de mejoramiento de Asociados Don Mario, susceptibles a NQS, denominadas para este estudio: R1 a R10. Todas las variedades utilizadas como padres recurrentes son genotipos convencionales (i.e. no transgénicos) y sus principales características fenotípicas se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características fenotípicas de las variedades recurrentes.

CG	CF	GM	Pub	PF	HC	H
R1	Púrpura	3.5	Gris	Tostado	Indeterminado	Negro
R2	Blanca	4.5	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro
R3	Púrpura	4.2	Castaño oscuro	Castaño	Indeterminado	Negro
R4	Púrpura	4.5	Castaño oscuro	Tost/Cast.	Indeterminado	Negro
R5	Púrpura	4.5	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro
R6	Púrp/Blan	4.6	Castaño oscuro	Castaño	Indeterminado	Negro
R7	Púrpura	4.8	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Marrón
R8	Púrp/Blan	4.8	Castaño claro	Oscura	Indeterminado	Negro
R9	Púrp/Blan	4.9	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro
R10	Púrpura	4.9	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro

CG: código genotipos; CF: color de flor; GM: grupo de madurez; Pub: pubescencia; PF: color de la pared del fruto; HC: hábito de crecimiento; H: color del hilo de la semilla.

#### **A.4. Siembra, muestreo y polinización**

Se sembraron a mano 15 semillas por metro lineal de cada uno de los materiales recurrentes, junto a 15 semillas del donante. Se realizaron tres fechas de siembra, separadas siete días entre sí, comenzando el 14 de Diciembre de 2012.

Se tomaron muestras de hoja en el estadio V1 (primera hoja totalmente expandida, Fehr *et al.*, 1971) para el análisis molecular.

##### **A.4.1. Proceso de muestreo de tejido vegetal**

1- Se colocaron etiquetas vinílicas para darle una identificación única e irrepetible a cada planta (Figura 3).



**Figura 3.** Plantas identificadas con vinilo previo al muestreo

2- Se colectó con sacabocados una muestra de 6 mm de diámetro (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Sacabocado de 6 mm para toma de muestra de hoja

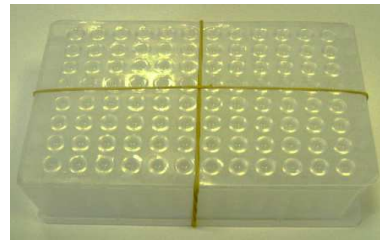


**Figura 5.** Toma de muestra: Recolección de disco de hoja.

3- Se colocó la muestra correspondiente a cada planta, previamente identificada, en la celda de una placa plástica de muestreo (Figuras 6 y 7).



**Figura 6.** Muestras en placa plástica de muestreo



**Figura 7.** Placa de muestreo debidamente tapada

4- Se mantuvieron las placas refrigeradas en conservadoras con hielo en gel, hasta que las muestras fueron enviadas al laboratorio para posterior liofilización (Figuras 8 y 9).



**Figura 8.** Muestras en conservadora



**Figura 9.** Liofilizador

#### **A.4.2. Proceso de Liofilizado**

La liofilización es un proceso de secado mediante sublimación que tiene el objetivo de mantener las propiedades organolépticas de un material, tejido vegetal en esta ocasión, y por lo tanto la conservación del mismo por largos períodos de tiempo. El proceso de liofilización consta principalmente de dos pasos: el primero consiste en congelar el producto y en el segundo paso el producto es secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (Orrego, 2008).

#### **A.4.3. Cruzas**

Se realizaron cruzamientos por medio de polinización artificial, conforme a la metodología utilizada actualmente en la mejora genética de la soja. La misma consiste en desprever de sépalos y pétalos un pimpollo sobre el parental que funcionará como “madre”, en esta ocasión el PR, dejando al descubierto el estigma sobre el cual se colocará polen directamente de las anteras tomadas de una flor del parental que se elige como padre, el PD (Figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Pimpollo pelado, estigma visible



**Figura 11.** Pimpollo pelado polinizado

### **A.5. Marcadores**

#### **A.5.1 Detección del gen objetivo**

Se caracterizó a los parentales para el MM-SSR Satt309 (Cregan *et al.*, 1999), mediante la técnica de microforesis. Inicialmente las determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de

Don Mario, en Chacabuco, más tarde con los mismos equipamientos en la UBA (Universidad de Buenos Aires).

El MM-SSR Satt309 (Tabla 3) es un marcador molecular que se posiciona a 0,4 cM del locus *rhg1* de resistencia a NQS, en el cromosoma 18 del genoma de la soja correspondiente al grupo de ligamiento G, con él puede ser detectado el alelo 3 (134 pb) proveniente de PI437654.

**Tabla 3.** MM-SSR Satt 309

Primer	Sequence (5' to 3')		Tm <sup>a</sup> (°C)
BARC-Satt309	Forward	GCG CCT TCA AAT TGG CGT CTT	64
	Reverse	GCG CCT TAA ATA AAA CCC GAA ACT	68

Tm<sup>a</sup> (Melting Temperatura): temperatura a la cual la doble hélice de ADN se disocia en dos simples hebras. Fuente: Cregan *et al.*, 1999.

#### **A.5.2. Proceso de extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN, y fue realizada utilizando el kit de extracción Kleargene (LGC Genomics, UK), a partir de un disco de hoja de 6 mm de diámetro (Figuras 12 y 13).



**Figura 12.** Extracción de ADN.  
Preparación de muestras en Eppendorf.



**Figura 13.** Extracción de ADN.  
Agregado de Kleargene

Se prepararon 20 ng de ADN genómico combinados con 300 nM de cada primer microsatélite antes detallado, 250  $\mu$ M de cada dNTP y 0,6 U de Taq Polimerasa (Hot Start) en un volumen final de reacción de 15  $\mu$ L.

La amplificación molecular del marcador microsatélite Satt309 se realizó en Termociclador Biorad MyCycler (Figura 14).



**Figura 14.** Termocicladores

El programa de amplificación utilizado en PCR (por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) fue el siguiente:

- 1- Desnaturalización inicial a 95 °C por 15 minutos.
- 2- 33 ciclos a 94 °C por 15 segundos.
- 3- 1 ciclo a 60 °C por 1 minuto.

El producto de la amplificación fue visualizado en gel de agarosa 4% coloreado con GelRed sobre luz UV (Figuras 15 y 16).



**Figura 15.** Colocación de muestras en gel con pipeta.



**Figura 16.** Primer plano de gel y muestras para la corrida.

### **A.5.3. Genotipado**

Se seleccionaron los 550 MM-SNP (detallados en el **Anexo 2**, Tabla 11) más polimórficos de un estudio previo de “fingerprint” que realizó Don Mario en el año 2010, el cual incluyó 96 variedades de soja y 1536 marcadores SNPs. Estos 550 MM-SNP fueron utilizados para caracterizar molecularmente la línea donante y las diez variedades recurrentes. Se enviaron muestras de todos los parentales a la empresa DNA Landmarks, Canadá, donde se llevó a cabo esta tarea.

El genotipado se realizó utilizando un espectrofotómetro de masas específicamente diseñado para aplicaciones genómicas, Mass Arrays Compact Analyzer, que puede analizar más de 3000 muestras por día (Agena Bioscience, San Diego, CA, USA).

Para los estudios de similitud se construyeron matrices en donde la presencia de un nucleótido deseado se expresaba con 1 y con 0 la ausencia del mismo, luego las matrices se analizaron con el programa Ntsys-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000), utilizando el coeficiente de similitud para variables cualitativas de doble estado, llamado coeficiente de emparejamiento simple de Sokal y Michener (Sneath & Sokal, 1973; Saiz, 1980) al igual que en los trabajos de Basheer-Salimia, 2014 y Perez, 2011, entre otros).

### **A.6. Fenotipado**

El fenotipado del genotipo donante y de los diez recurrentes, para resistencia/susceptibilidad a raza 3 de NQS se realizó en los invernáculos de Brasmax (Grupo Don Mario) ubicados en Londrina, Brasil (Niblack, 2005; Riggs, 1991).

#### **A.6.1 Evaluación de reacción de genotipos frente a *Heterodera glycines***

##### **I. Siembra de patrón de susceptibilidad y preparación de inóculo**

I.I. Se sembraron semillas del genotipo patrón de susceptibilidad (cv. Lee 74) en recipientes de 50 cm de diámetro, y se mantuvieron a 25°C.

I.II. Cuando las plantas alcanzaron el estadio VE (emergencia de cotiledones), a siete días de la siembra, se trasplantaron cada una a un recipiente que contenía la mezcla suelo-arena en proporción 1:2 (v/v) infectada con huevos de *Heterodera glycines*.

I.III. Luego de 28 a 30 días a temperatura entre 25 – 30 °C en invernáculo y 16 horas de luz, se recolectaron las raíces de las plantas de soja susceptibles de los recipientes previamente preparados.

I.IV Se lavaron las raíces para la extracción de las hembras de *Heterodera glycines*. Se analizó el tamaño de partículas usando dos tamices superpuestos de malla de alambre N° 25 y N° 100 (el tamiz N° 25 sobre el tamiz N° 100) (Figura 17 y 18).



**Figura 17.** Lavado de raíces



**Figura 18.** Paso por tamices

I.V. Las hembras retenidas en el tamiz de malla N° 100 fueron maceradas, reteniendo los huevos del nemátodo en un tamiz de malla N° 500 (el tamiz N° 100 sobre el tamiz N° 500) (Figuras 19 y 20).



**Figura 19.** Hembras de NQS en tamiz



**Figura 20.** Macerado de hembras de NQS

I.VI. Se dejó correr toda el agua acumulada en el tamiz de malla N° 500.

I.VII. Se pasó el material retenido en el tamiz (huevos, el suelo, tejido, etc.) a los tubos de centrífuga previamente preparados usando una solución de sacarosa (454 g de azúcar en 1 litro de agua).

I.VIII. Ya con el material en el tubo de centrífuga se agitó la solución con una varilla de vidrio para ayudar la suspensión de los huevos de NQS.

I.IX. Se pesaron los tubos, se colocaron en la centrífuga de modo que el peso quedó balanceado y se centrifugaron durante 60 segundos a 1800 RPM.

I.X. Se separó el sobrenadante en tamiz de malla N° 500 y se eliminó la sacarosa utilizando solamente agua.

I.XI. Se pasaron los huevos a un recipiente con volumen necesario para la inoculación de los materiales a ser tratados.

I.XII. Luego de agitar bien la suspensión se pipeteó una pequeña cantidad y se realizó el conteo de 1 ml en una cámara de recuento (Figura 21 y 22). Se trabajó con 1.000 huevos por ml.



**Figura 21.** Tamices y cámara de recuento



**Figura 22.** Recuento de quistes en microscopio

## II. Siembra de recipientes a testear, inoculación y lectura de resultados.

II.I. Se sembraron las semillas a ser testeadas en potes de 50 cm de diámetro. También se sembraron semillas del genotipo utilizado como patrón de susceptibilidad (Lee 74), y de una variedad resistente a NQS (DM 5913) como controles susceptible y resistente, respectivamente (Figura 23). Los potes se mantuvieron a 25°C durante la germinación de las semillas e inicio del crecimiento de las plántulas.



**Figura 23.** Siembra en potes de semillas a ser testeadas

II.II. Cuando las plántulas alcanzaron el estadio VE (emergencia de cotiledones), a siete días de la siembra, se trasplantaron cada una de las plantas sanas a un recipiente que contenía la mezcla suelo-arena en proporción 1:2 (v/v).

II.III. Con el inóculo previamente preparado, se realizó la inoculación de las raíces de las plántulas trasplantadas, cuidando que el suelo de los potes no estuviera ni muy seco ni muy húmedo al momento de la inoculación.

II.IV. Para la inoculación se utilizó una pipeta automática, tomando la precaución de homogeneizar la solución conteniendo el inóculo antes de cada pipeteada. El volumen de inoculación fue de 4 ml, con una concentración de aprox. 1000 huevos de nematodo por ml. Es decir que se inocularon aprox. 4000 huevos por cada plántula (Figura 24).



**Figura 24.** Inoculación

II.V. Después de la inoculación, las raíces de las plantas fueron rápidamente cubiertas con suelo para evitar la desecación. Las inoculaciones se realizaron temprano en la mañana o a última hora de la tarde, para evitar condiciones de estrés para los nemátodos.

II.VI. Se dejó que las plantas inoculadas se desarrollen durante 30 días en condiciones de invernáculo (Figura 25).



**Figura 25.** Vista de ensayo en invernáculo

### **III- Evaluación**

III.I. Después de 28 – 30 días desde la inoculación se extrajeron las plantas del patrón susceptible, y la de los materiales resistentes y se confirmó visualmente el nivel de infestación del primero y que los genotipos resistentes estuviesen perfectamente sanos. Los quistes del nemátodo se ven a simple vista. Se recolectaron luego las raíces de las plantas de soja susceptibles de los recipientes previamente preparados.

III.II. Teniendo en cuenta el número de quistes que se detectaron en el material susceptible se creó una escala del 1 al 10, donde 1 era un material totalmente sano (sin quistes) y 10 un material con la misma cantidad o menos de 10 por ciento de diferencia en cantidad de quistes con el patrón susceptible. La escala utilizada es una escala fija para esta metodología que utiliza personal entrenado para la misma. La idea de sembrar siempre los materiales susceptibles y resistentes es confirmar que la inoculación fue exitosa.

III.III. Luego se determinó mediante observación visual qué número de esta escala del 1 al 10 le correspondía a cada genotipo testeado. Plantas del 1 al 3 se clasificaron como resistentes y del 7 al 10 fueron clasificadas como susceptibles.

## ***B. PRIMERA RETROCRUZA (RC1)***

### **B.1. Primera retrocruza**

La primera retrocruza se llevó a cabo el invierno del 2013, en invernáculo (Figuras 26 y 27), con temperatura y fotoperiodo controlados, y riego manual, situado dentro de las instalaciones del semillero Don Mario, en Chacabuco, Bs. As. (Figuras 26 y 27).

Temperatura mínima invernáculo: 24°C

Temperatura máxima invernáculo: 30 °C

Temperatura media invernáculo: 27 °C

Humedad: 65%

Horas de Luz: 14 horas



**Figura 26.** Invernáculo Don Mario 1



**Figura 27.** Invernáculo Don Mario 2

### **B.2. Germoplasma**

#### **B.2.1. Donantes utilizados en la primera retrocruza**

Luego del primer ciclo de cruzamiento, se avanzó únicamente con dos de las progenies F1, denominadas 502 y 503, derivadas de los genotipos recurrentes R2 y R5, respectivamente, las cuales fueron utilizadas como parentales donantes en las retrocruzas. Esta selección se basó primero en que los parentales recurrentes elegidos pudieron ser bien diferenciados del parental recurrente con Satt309, y segundo en la cantidad de semillas F1 logradas (46 y 25 semillas para las progenies 502 y 503, respectivamente).

### B.2.2. Recurrentes

Como material recurrente se utilizaron las variedades R2 y R5, recurrentes de los genotipos que avanzaron. Su semilla se obtuvo de la cosecha de los mismos en el ciclo anterior.

### B.3. Siembra, muestreo y polinización

Para esta generación se sembraron cinco semillas por maceta, en macetas plásticas de cinco litros (Figura 28). Como sustrato de crecimiento se utilizó una mezcla con: 3 partes de tierra negra, 2 partes de turba, 1 parte de arena y 1 parte de perla.

Se realizaron tres fechas de siembra del material recurrente, de cinco macetas cada una, espaciadas siete días entre ellas. La primera fecha de siembra fue el 20 de Julio del 2013. Se realizaron dos fechas de siembra del material donante, coincidentes con la primera y segunda fecha de siembra del material recurrente.

Se tomaron muestra de hoja en el estadio V1 para analizar con el MM-SSR Satt309 (Figura 29).



**Figura 28.** Plántulas en invernáculo



**Figura 29.** Muestreo en invernáculo

La humedad del suelo de las macetas se mantuvo alta utilizando un sistema automático de riego por goteo con el objeto de mantener alto el nivel de turgencia de los tejidos vegetales (Figuras 30 y 31).



**Figura 30.** Riego por goteo



**Figura 31.** Vista general

## **B.4. Marcadores**

### **B.4.1. Detección del gen objetivo**

La detección del gen *rhg1* en las plantas F1 donantes (46 F1 de la cruza 502 y 25 F1 de la cruza 503) se realizó utilizando el MM-SSR Satt309, ligado al mismo.

### **B.4.2. Genotipado**

No se realizó genotipado en esta instancia pues las F1 se constituyen en un 50% del parental recurrente y el otro 50% del parental donante.

Se avanzó únicamente con aquellas F1 que contenían el locus de resistencia objetivo: *rhg1* (43 F1 de la cruza 502 y 21 F1 de la cruza 503).

## ***C. SEGUNDA RETROCRUZA (RC2)***

### **C.1. Lugar**

La RC2 fue realizada en el verano 2013-2014, en el campo de cría del semillero Don Mario S.A., en la ciudad de Chacabuco, Bs. As.

### **C.2. Germoplasma**

- **Donantes:** fueron utilizadas como PD las semillas RC1F1 obtenidas en el ciclo anterior (148 RC1F1 de la cruza 502 y 54 RC1F1 de la cruza 503).

- **Recurrente:** el material recurrente consistió en las mismas variedades recurrentes cosechadas en el ciclo anterior (R2 y R5).

### **C.3. Siembra, muestreo y polinización**

Se realizaron tres fechas de siembra de material recurrente, espaciadas siete días entre ellas. Cada una contó con 50 semillas sembradas en 2.5 m. La primera fecha fue el 27 de Diciembre de 2013.

Se realizó una fecha de siembra del material donante junto a la segunda fecha de siembra del material recurrente. En este caso no se dividió la semilla en varias fechas de siembra con el objetivo de realizar el muestreo para MM de manera simultánea y poder sincronizar las tareas.

Se tomaron muestras de hojas de las plantas RC1F1 en el estadio V1 para analizar con el MM-SSR Satt309 la presencia/ausencia del locus objetivo, *rhg1*. Luego se realizó un segundo muestreo de hoja, utilizando únicamente aquellas plantas que contenían el locus *rhg1* para caracterizar a las mismas molecularmente, con los MM-SNP seleccionados previamente, en DNA Landmarks.

#### **C.4. Marcadores**

- **Detección del gen objetivo:** Se caracterizó a los parentales donantes (148 RC1F1 de la cruza 502 y 52 RC1F1 de la cruza 503) para el MM-SSR Satt 309.

- **Genotipado:** Se realizó la caracterización molecular utilizando MM-SNPs de todas aquellas plantas RC1F1 que contenían el locus *rhg1* (74 RC1F1 para la cruza 502 y 27 RC1F1 para la cruza 503), enviando las muestras de las mismas a DNA Landmarks.

### ***D. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F1)***

#### **D.1. Siembra y muestreo**

El avance de generación de las semillas RC2F1 que se obtuvieron en el ciclo anterior (233 RC2F1 para la cruza 502 y 68 RC2F1 para la cruza 503) fue realizado a campo, en la ciudad de De Witt, en el condado de Arkansas, Estados Unidos. Allí se encuentra otra estación experimental denominada DM Seeds que pertenece, junto a Don Mario, al Grupo Don Mario Seeds.

Se sembraron el día 20 de Mayo del 2014 las semillas RC2F1 y sus respectivos parentales recurrentes en surcos de 5 m.

Se tomaron muestras de hoja en el estadio V2 (segunda hoja totalmente expandida) para analizar con el MM-SSR Satt309 la presencia/ausencia del locus objetivo, *rhg1*. Luego se realizó

un segundo muestreo de hoja, utilizando únicamente aquellas plantas que contenían el locus, *rhg1*, para caracterizar molecularmente, con los MM-SNP seleccionados en DNA Landmarks.

## **D.2. Marcadores**

- **Detección del gen objetivo:** Se caracterizó a los individuos RC2F1 para el MM-SSR Satt 309.
- **Genotipado:** Se realizó la caracterización molecular utilizando MM-SNPs de todas aquellas plantas RC2F1 que contenían el locus *rhg1* (109), enviando las muestras de las mismas a DNA Landmarks.

## **D.3. Cosecha y trilla**

Se cosecharon individualmente las plantas de interés, se trillaron con trilladora estática (Almaco) y se enviaron de vuelta a Don Mario SA, Chacabuco, Argentina.

## ***E. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F2)***

### **E.1. Siembra y muestreo**

El avance de generación de las semillas RC2F2, cosechadas en el ciclo anterior, fue realizado en el campo de cría del semillero Don Mario S.A., en la ciudad de Chacabuco, Bs. As.

El 18 de Noviembre de 2014 se sembraron 200 semillas RC2F2, de cada una de las progenies RC2F1 comprendidas en el rango de 94 a 97% de similitud con el PR en el ciclo anterior, para la cruce 502, junto con sus respectivos parentales donante y recurrente, en surcos de 9 m.

Se avanzó únicamente con una población de origen cruce 502, correspondiente a aquella de mayor similitud. Se tomaron muestras de hoja en el estadio V2 para analizar la presencia/ausencia del locus objetivo, *rhg1*. El muestreo fue realizado solamente en aquella población F2 que había tenido el mayor porcentaje de similitud en la generación anterior (97%). Luego se realizó otro muestreo de hoja para caracterizar molecularmente aquellas plantas que contenían el locus *rhg1* en estado homocigota.

## **E.2. Marcadores**

- **Detección del gen objetivo:** Se caracterizó a los individuos RC2F2 para el MM-SSR Satt309.
- **Genotipado:** Se realizó la caracterización molecular utilizando MM-SNPs de todas aquellas plantas RC2F2 que contenían el locus *rhg1*, enviando las muestras de las mismas a DNA Landmarks.

Para el genotipado de todos los individuos originados de retrocruzas se utilizaron únicamente aquellos marcadores que habían sido polimórficos en el análisis de los parentales.

## **E.3. Toma de datos**

El motivo de la siembra de poblaciones de entre 94 y 97% de similitud con el PR y de ambos parentales de la cruce 502, fue realizar una comparación visual de la similitud entre todos ellos, pues en esta generación aún no se realizan evaluaciones de rendimiento.

Se tomaron datos de color de flor, color de pubescencia y vaina, madurez a cosecha, vuelco y aspecto general.

## **E.4. Evaluación Fenotípica**

Luego del análisis con MM-SNPs se evaluaron fenotípicamente aquellos individuos de mayor similitud con el PR, utilizando los parámetros anteriormente descriptos.

## **E.5. Cosecha y trilla**

Se cosecharon individualmente las plantas de interés, se trillaron con trilladora estática (Almaco) y se enviaron a DM SEEDS para realizar el primer ensayo de evaluación de rendimiento en microparcels (EER) durante el invierno 2015.

## ***F. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO PRELIMINAR (EER)***

Para este EER se sembraron el día 16 de Mayo del 2015, en la ciudad de De Witt, Arkansas, dos parcelas del parental recurrente, R2 (correspondiente a la cruce 502) y las parcelas

de los 4 individuos 100% similares a R2, que contenían el gen de interés *rhg1*, para luego realizar una evaluación de rendimiento preliminar.

Las microparcels consisten en parcelas originadas de plantas individuales, de 3 mts de largo y 20 semillas por metro. Por lo tanto una parcela corresponde a la progenie derivada de una planta sin repeticiones. R2 fue sembrado de la misma forma pero en dos repeticiones ya que se contaba con más semilla del mismo.

Este ensayo se cosechó el día 29 de Septiembre. Se realizó un análisis estadístico calculando promedio y error estándar para comparar los rendimientos de los individuos mencionados con los valores de R2 utilizando el programa estadístico Infostat Libre, versión 2015.

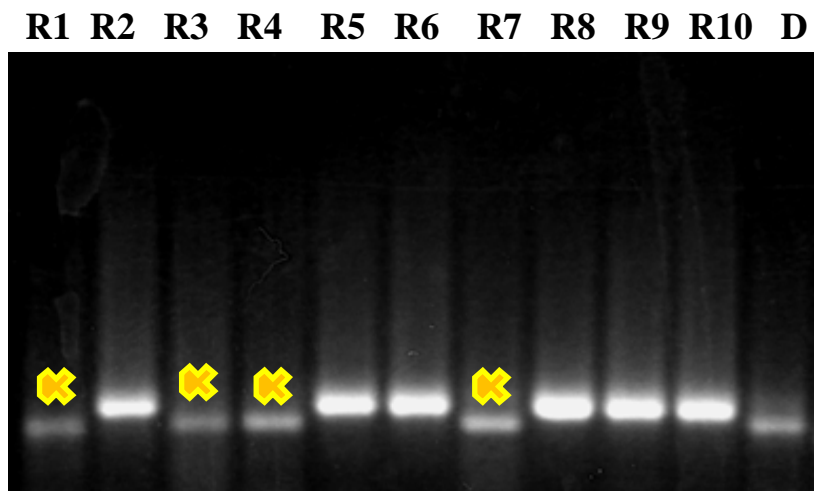
## RESULTADOS

### A. CRUZAMIENTO INICIAL

- **Detección del gen objetivo:** Todas las plantas donantes mostraron presencia del locus *rhg1* para el MM-SSR Satt309. Las variedades recurrentes R1, R3, R4 y R7 no pudieron diferenciarse del PD con este marcador. Las variedades recurrentes R2, R5, R6, R8, R9 y R10 mostraron ausencia del gen *rhg1* para el MM-SSR Satt309, quedando claramente diferenciadas del PD (Figura 32).

.

### Satt 309



**Figura 32.** Resultado de ampliación para el marcador SSR Satt309 en gel de agarosa. D: parental donante, R1 a R10 parentales recurrentes.

- **Genotipado con MM-SNP.** Luego del genotipado se pudieron observar:

- i) La cantidad de MM-SNPs polimórficos por crusa específica.
- ii) La distribución de los MM-SNPs a través del germoplasma.
- iii) La similitud genética entre parentales según los 550 MM-SNPs utilizados.

- i) La cantidad de MM-SNP polimórficos por crusa (Tabla 4) específica varió entre 171 y 255, correspondiendo a un promedio 37.3 % del total de los marcadores utilizados para el genotipado (550 SNP) (Tabla 5).

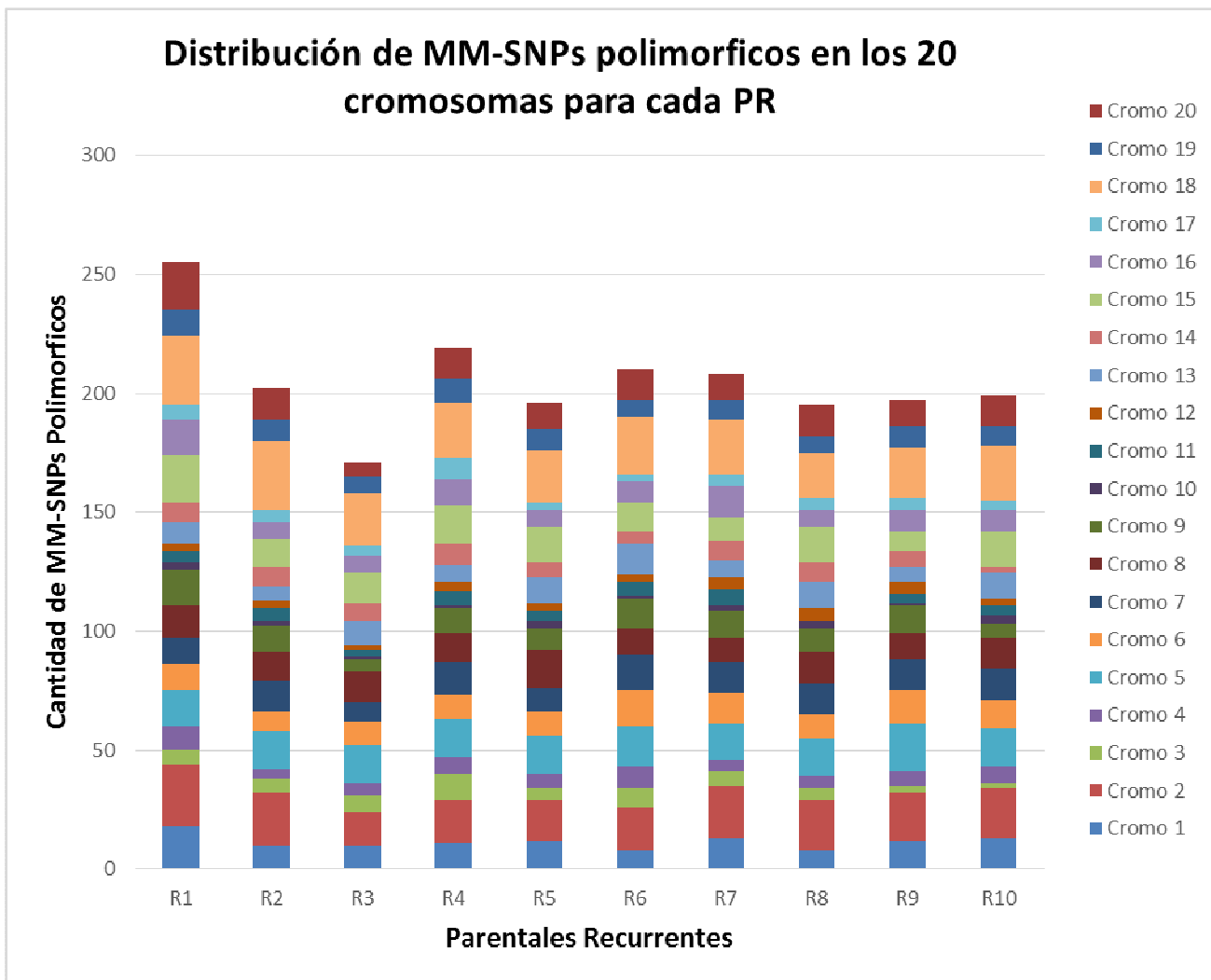
**Tabla 4.** Cantidad de MM-SNPs polimórficos por crusa.

	R1 x D	R2 x D	R3 x D	R4 x D	R5 x D	R6 x D	R7 x D	R8 x D	R9 x D	R10 x D
<b>MM Polimorficos</b>	255	202	171	219	196	210	208	195	197	199
<b>MM Monomórficos</b>	258	318	336	292	309	291	294	316	306	308
<b>Datos perdidos</b>	37	30	43	39	45	49	48	39	47	43
<b>Total</b>	550	550	550	550	550	550	550	550	550	550

R1 a R10: Recurrentes; D: Donante; Rn x D: tipo de crusa específica

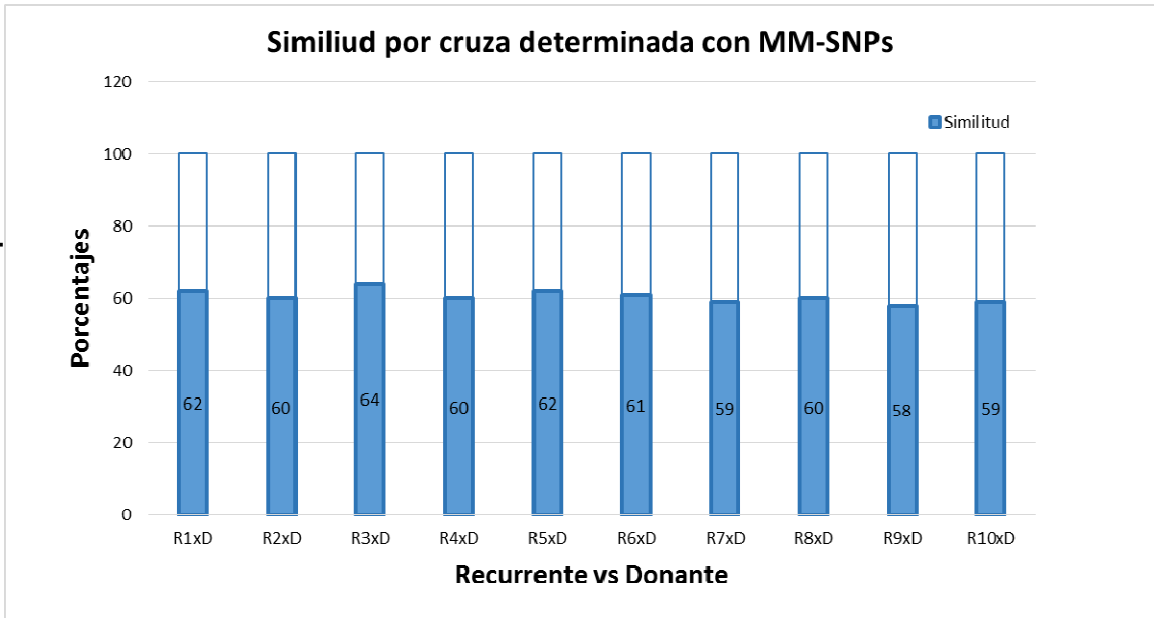
- La cantidad de MM-SNP considerados datos perdidos en esta primer etapa varió entre 30 y 49, correspondiendo a un 7.6 %, en promedio, del total de los marcadores utilizados para el genotipado (550 SNP).

- ii) La distribución de los MM-SNP a través del germoplasma fue homogénea, con un promedio de 10.3 SNPs en cada uno de los 20 cromosomas de la soja (Figura 33).

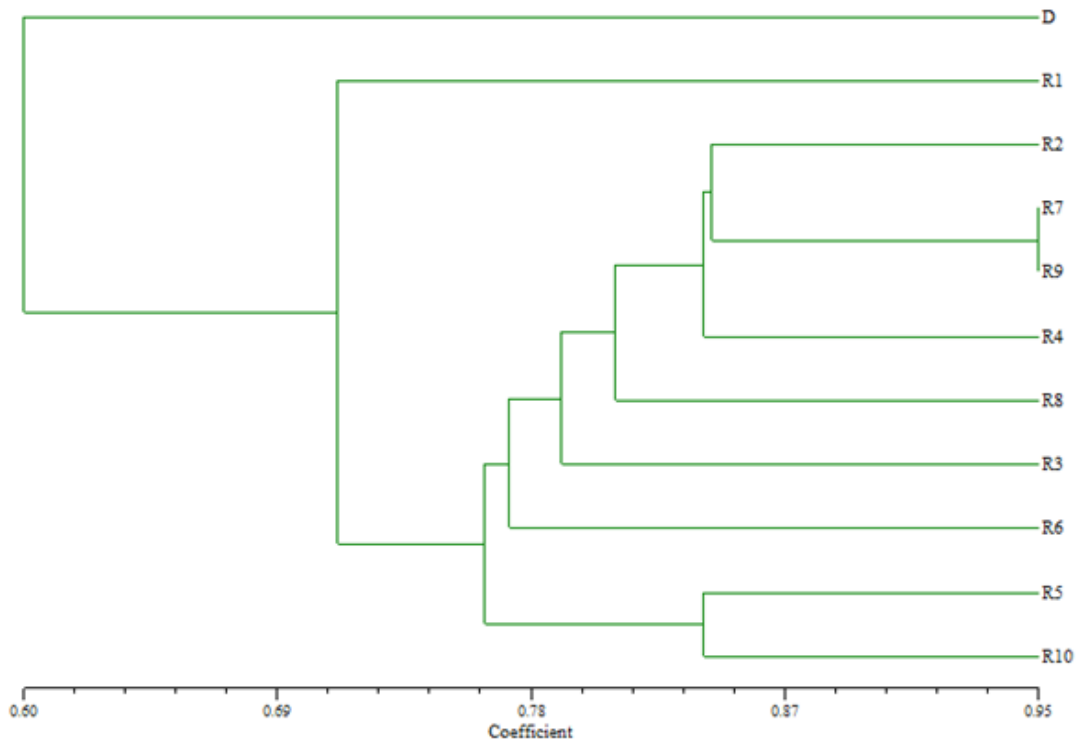


**Figura 33.** Distribución de MM-SNPs en cromosomas para cada parental recurrente. Cada color corresponde a uno de los 20 cromosomas, cuanto más ancho el color más MM-SNPs en ese cromosoma.

iii) La similitud genética entre parentales según los 550 MM-SNPs utilizados (Figura 34 y 35).



**Figura 34.** Porcentaje de similitud por cruzamiento.



**Figura 35.** Árbol representativo de la similitud entre genotipos recurrentes y el parental donante. R1 a R10: recurrentes; D: donante.

**Fenotipado:** Luego del fenotipado, realizado sobre plantas inoculadas artificialmente con NQS, los datos que se obtuvieron estuvieron dentro de lo esperado, siendo los genotipos recurrentes susceptibles y el parental donante resistente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados del fenotipado de los parentales

ID	Repeticiones						Reacción
	1	2	3	4	5	6	
R1	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R2	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R3	Susceptible	/	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R4	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R5	Susceptible	/	Susceptible	Susceptible	Susceptible	/	Susceptible
R6	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	/	Susceptible
R7	Susceptible	/	Susceptible	Susceptible	Susceptible	/	Susceptible
R8	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R9	/	/	Susceptible	Susceptible	Susceptible	/	Susceptible
R10	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
D	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	/	Resistente	Resistente

ID: identificación de parentales; R1 a R10: Recurrentes; D: Donor Hartwig

### **B. PRIMER RETROCRUZA (RC1)**

- **Detección del gen objetivo utilizando el MM-SSR Satt309:** De las 46 plantas F1 muestreadas para la *cruga* 502, cuatro fueron datos perdidos y 43 llevaban el locus de interés, *rhg1* (Figura 36).



**Figura 36.** Producto de ampliación en gel de agarosa para individuos F1 correspondientes a la cruga 502. **R2:** Padre Recurrente correspondiente a la cruga 502, **D:** Padre donante correspondiente a la misma cruga.

- De las 25 plantas F1 muestreadas para la **cruza 503**, cuatro no contenían el gen de interés y 21 sí llevaban el gen de interés, *rhg1*.
- El porcentaje de plantas F1 con el gen de interés para cada crusa confirma una buena eficiencia en los cruzamientos realizados (Tabla 6).

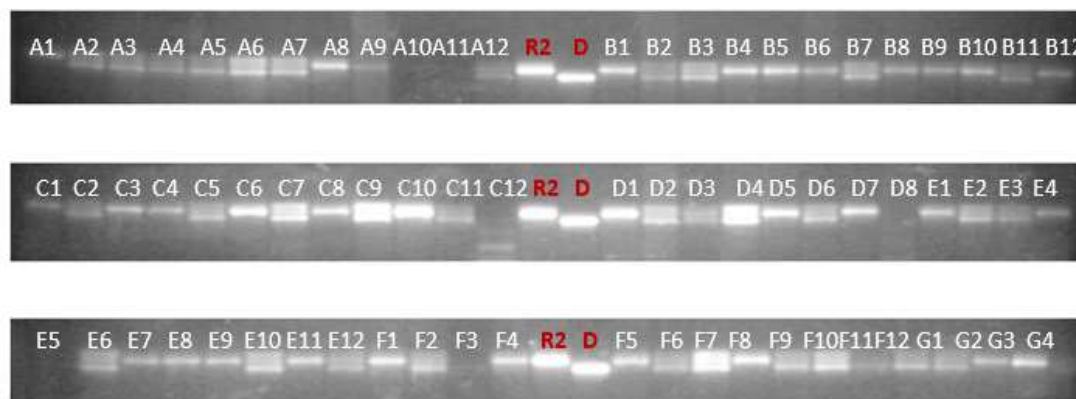
**Tabla 6.** Cantidad de F1 por crusa evaluada con y sin el gen de interés, *rhg1*.

CRUZA	PTM	PLTS CON <i>rhg1</i>	PLTS SIN <i>rhg1</i>	% CRUZA EFECTIVA	% CRUZA NO EFECTIVA
502	46	43	3	93	7
503	25	21	4	84	16

PTM: plantas F1 totales muestreadas, PLTS: plantas.

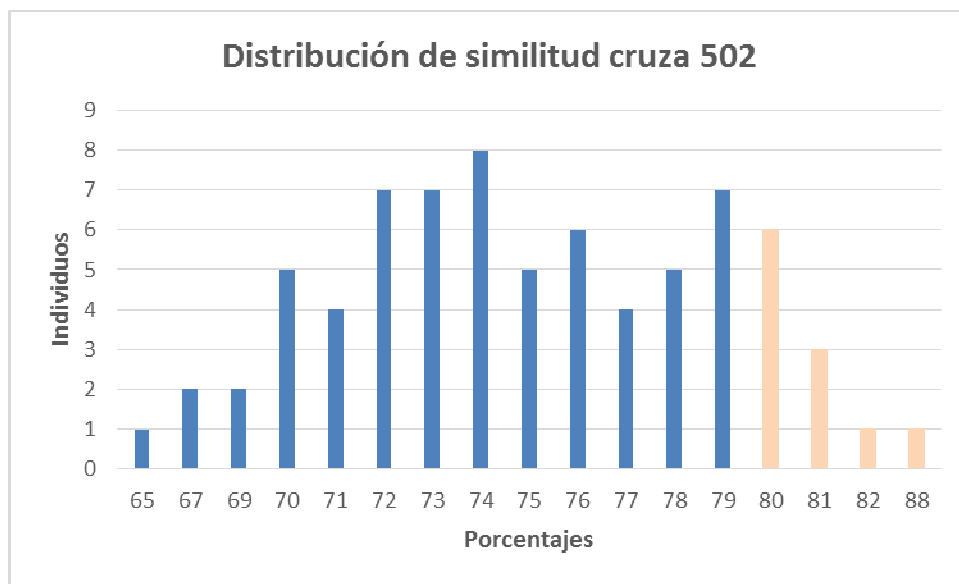
### **C. SEGUNDA RETROCRUZA (RC2)**

- **Detección del gen objetivo:** El 50 % de las plantas muestreadas para la progenie RC1F1 de ambas cruzas (148 RC1F1 para la crusa 502 y 54 RC1F1 para la crusa 503) contenían el locus de interés, *rhg1* (Figura 37), quedando un total de 74 individuos para la crusa 502 y 27 individuos para la crusa 503.



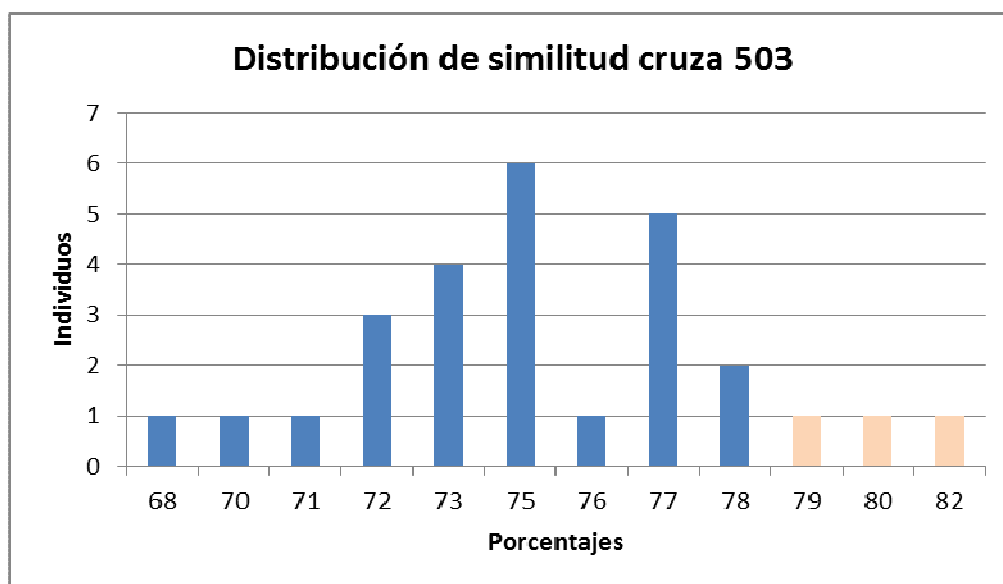
**Figura 37.** Producto de ampliación para algunos individuos RC1F1 de la crusa 502. **R2:** Padre Recurrente correspondiente a la crusa 502, **D:** Padre donante. A1 a G4 individuos RC1F1

- **Genotipado utilizando SNPs:** Los porcentajes de similitud con el parental recurrente, de la progenie RC1F1 de la cruz 502, oscilaron entre 65% y 88%, con un promedio esperado para esta generación de 75% (Figura 38).



**Figura 38.** Porcentajes de similitud con el padre recurrente de la progenie RC1F1, de la cruz 502.

- Los porcentajes de similitud con el parental recurrente, de la progenie RC1F1 de la cruce 503, oscilaron entre 68% y 82%, con un promedio esperado para esta generación de 75% (Figura 39).



**Figura 39.** Porcentajes de similitud con el padre recurrente de la progenie RC1F1, de la cruce 503.

#### **D. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F1)**

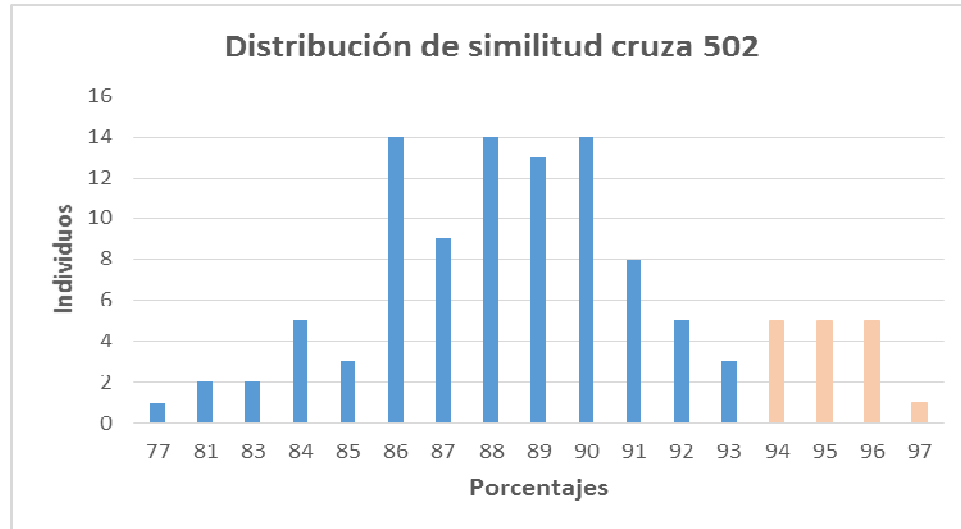
##### **- Detección del gen objetivo utilizando el MM-SSR Satt309**

De los 233 individuos muestreados para la cruce 502, 109 individuos contenían el locus de interés *rhg1*, correspondiendo al 47% del total de individuos.

De los 68 individuos muestreados para la cruce 503, 36 individuos contenían el locus de interés *rhg1*, correspondiendo al 53% del total de individuos.

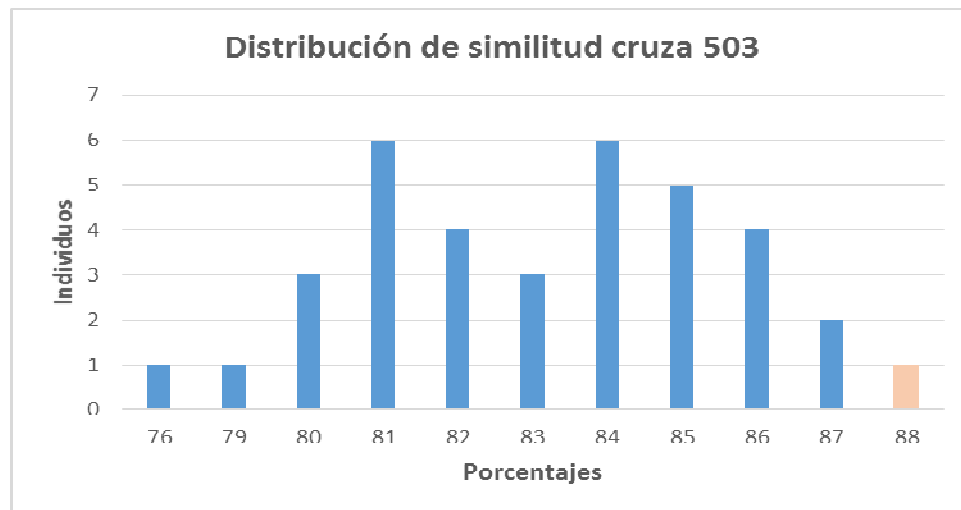
**- Genotipado utilizando MM-SNPs de las progenes RC2F1, de las cruces 502 y 503** Los porcentajes de similitud con el parental recurrente, de la progenie RC2F1 de la cruce 502 (74),

oscilaron entre 77% y 97%, con un promedio de 89%, superior al 87.5% esperado para esta generación de retrocruza (Figura 40).



**Figura 40.** Porcentajes de similitud con el padre recurrente de la progenie RC2F1, de la cruz 502.

Los porcentajes de similitud con el parental recurrente, de la progenie RC2F1, de la cruz 503, oscilaron entre 76% y 88%, con un promedio de 83%, inferior al 87.5% esperado para esta generación de retrocruza (Figura 41). Esto podría deberse a la poca cantidad de individuos que se obtuvieron en esta cruz para esta generación (68 individuos totales, 36 conteniendo el gen *rhg1*). Lo cual indica la importancia de mantener un número de población no inferior a 100 individuos.



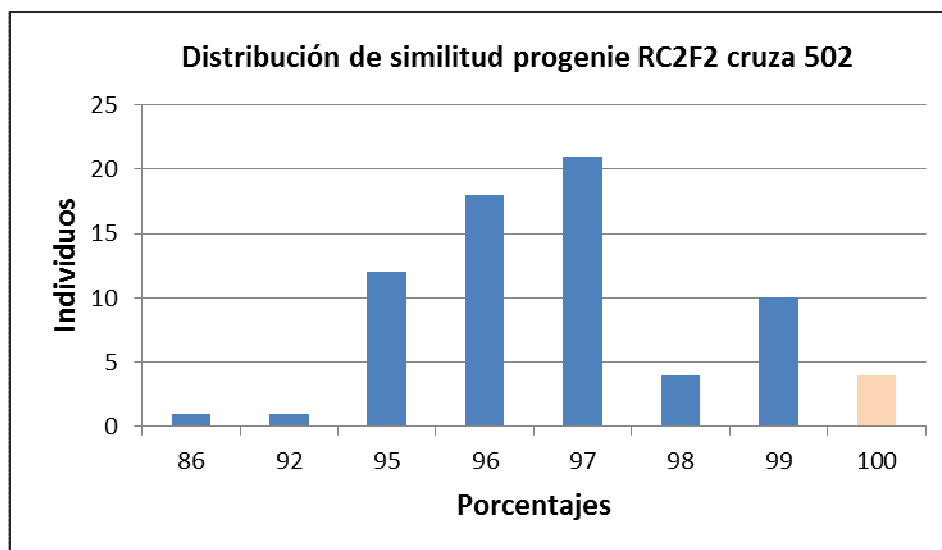
**Figura 41.** Porcentajes de similitud con el padre recurrente de la progenie RC2F1, de la cruz 503.

### **E. AVANCE DE GENERACIÓN (RC2F2)**

#### **- Genotipado**

- Los resultados de similitud para la población RC2F2, de la progenie RC2F1 más similar al parental recurrente (97%), oscilaron entre 86% y 100%, con un promedio esperado de 97% (Figura 42).

- Un 5,6% de los individuos totales muestreados para esta población (71) alcanzaron el 100% de similitud con el parental recurrente y un 19,7% de los individuos se encontraron entre 99 y 100% de similitud con el mismo.



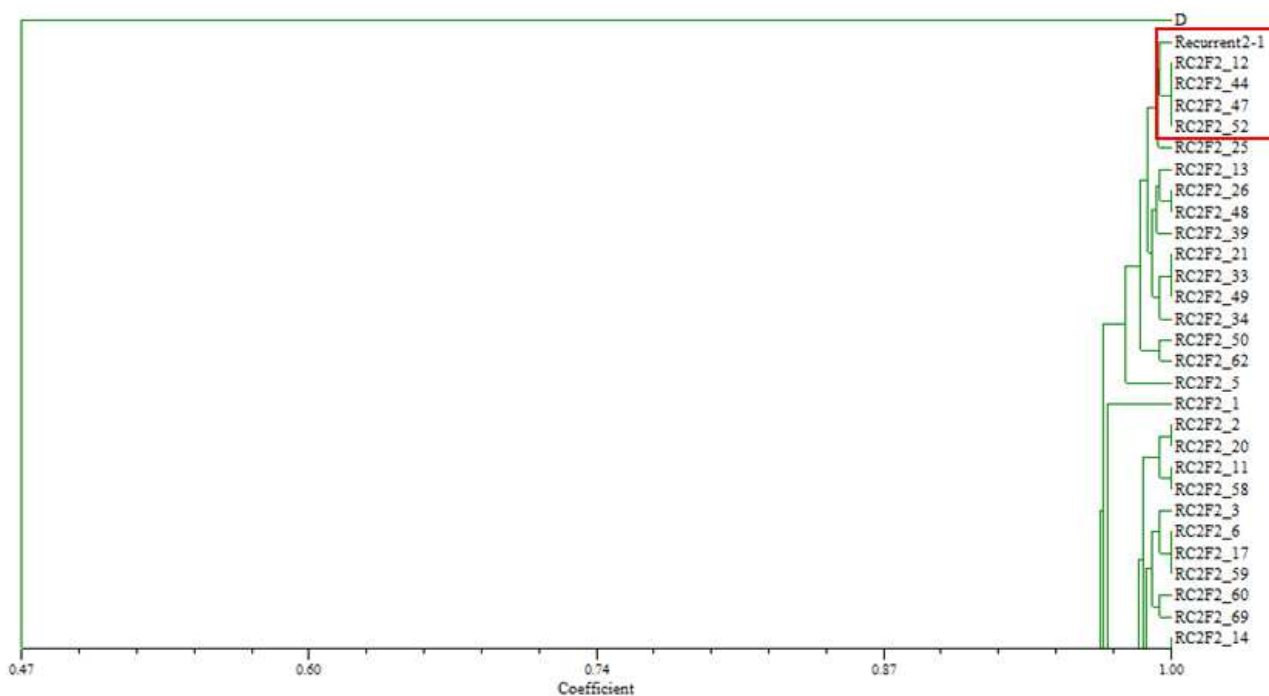
**Figura 42.** Porcentajes de similitud con el padre recurrente de la progenie RC2F2, de la cruza 502.

- Para el genotipado de cada retrocruza se respetó la cantidad de MM-SNP polimórficos detectados en el genotipado de los parentales. Solamente se eliminaron del análisis aquellos marcadores que se consideraron datos perdidos por ser erróneos en más del 10 % de los individuos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Cantidad de MM-SNP polimórficos e individuos por generación

	F1		RC1F1		RC2F1		RC2F2	
	MM-SNP	Individuos	MM-SNP	Individuos	MM-SNP	Individuos	MM-SNP	Individuos
<b>Cruza 502</b>	202	43	164	74	154	109	120	71
<b>Cruza 503</b>	196	21	187	32	178	36	-	-

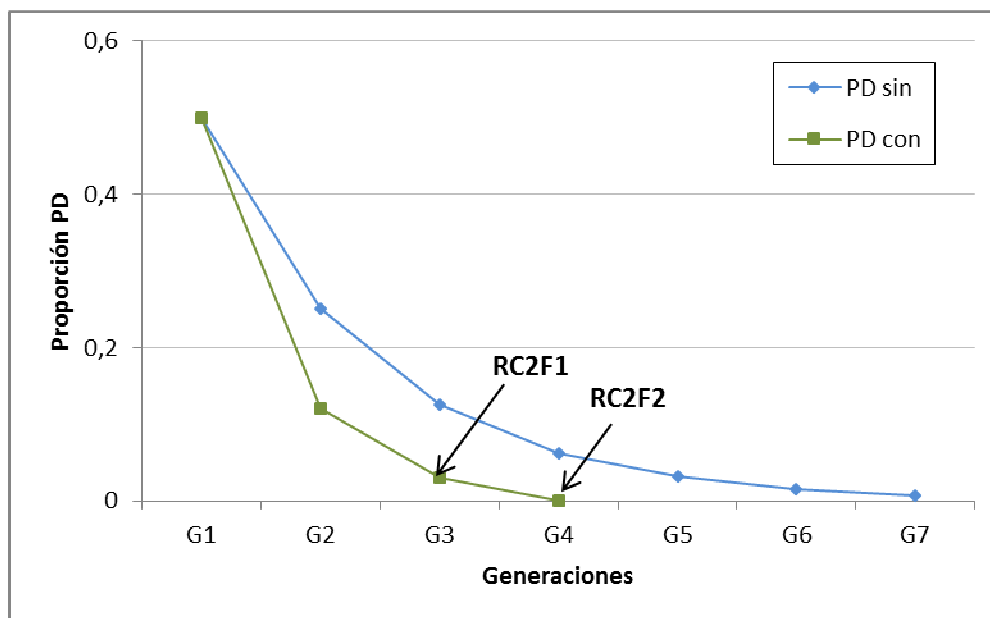
- En la Figura 43 se visualizan el parental donante en un grupo individual separado y el recurrente con parte de la progenie RC2F2. En el recuadro rojo se remarcaron los cuatro individuos 100% similares al parental recurrente.



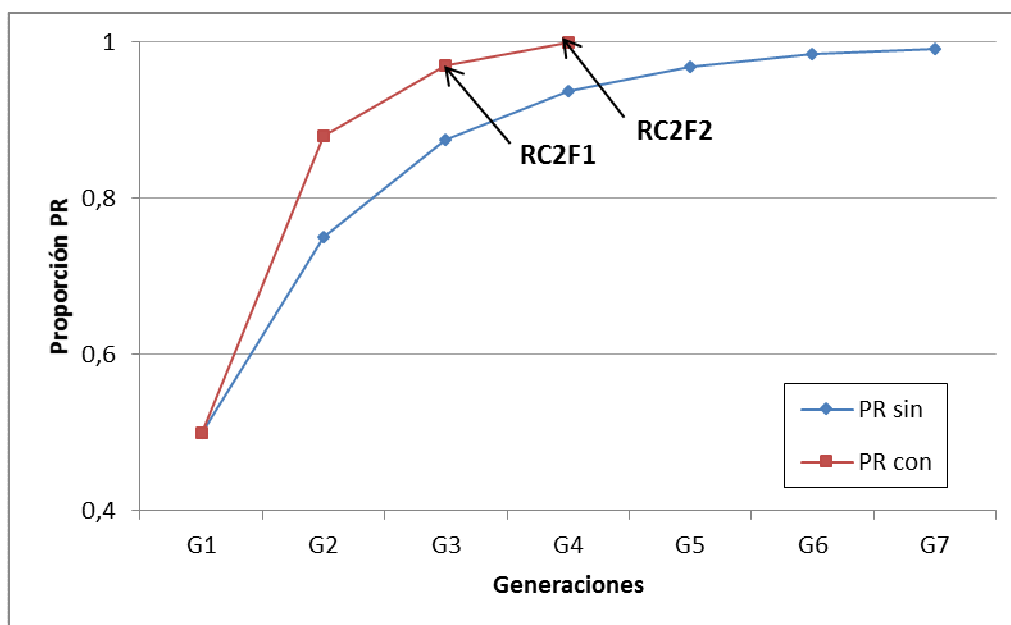
**Figura 43.** D: Parental Donante. Recurrente 2-1: Parental Recurrente;  
RC2F2\_n: individuos RC2F2

- En las Figuras 44 y 45 se representa una comparación gráfica de la proporción de parental donante y parental recurrente con y sin la asistencia de marcadores moleculares para la recuperación del parental recurrente. Se observa que el resultado global obtenido, al comparar la reducción del germoplasma donante (Figura 44) y al mismo tiempo el aumento del germoplasma

recurrente (Figura 45) a través de las generaciones para el método de retrocruza tradicional y el de retrocruza asistida por marcadores moleculares.



**Figura 44.** Reducción de la proporción de germoplasma del parental donante a través de generaciones sucesivas de retrocruzas. PD: Parental Donante. sin: retrocruza tradicional. con: retrocruza asistida con MM-SNP.



**Figura 45.** Aumento de la proporción de germoplasma del parental recurrente a través de generaciones sucesivas de retrocruzas. PR: Parental Recurrente. sin: retrocruza tradicional. con: retrocruza asistida con MM-SNP.

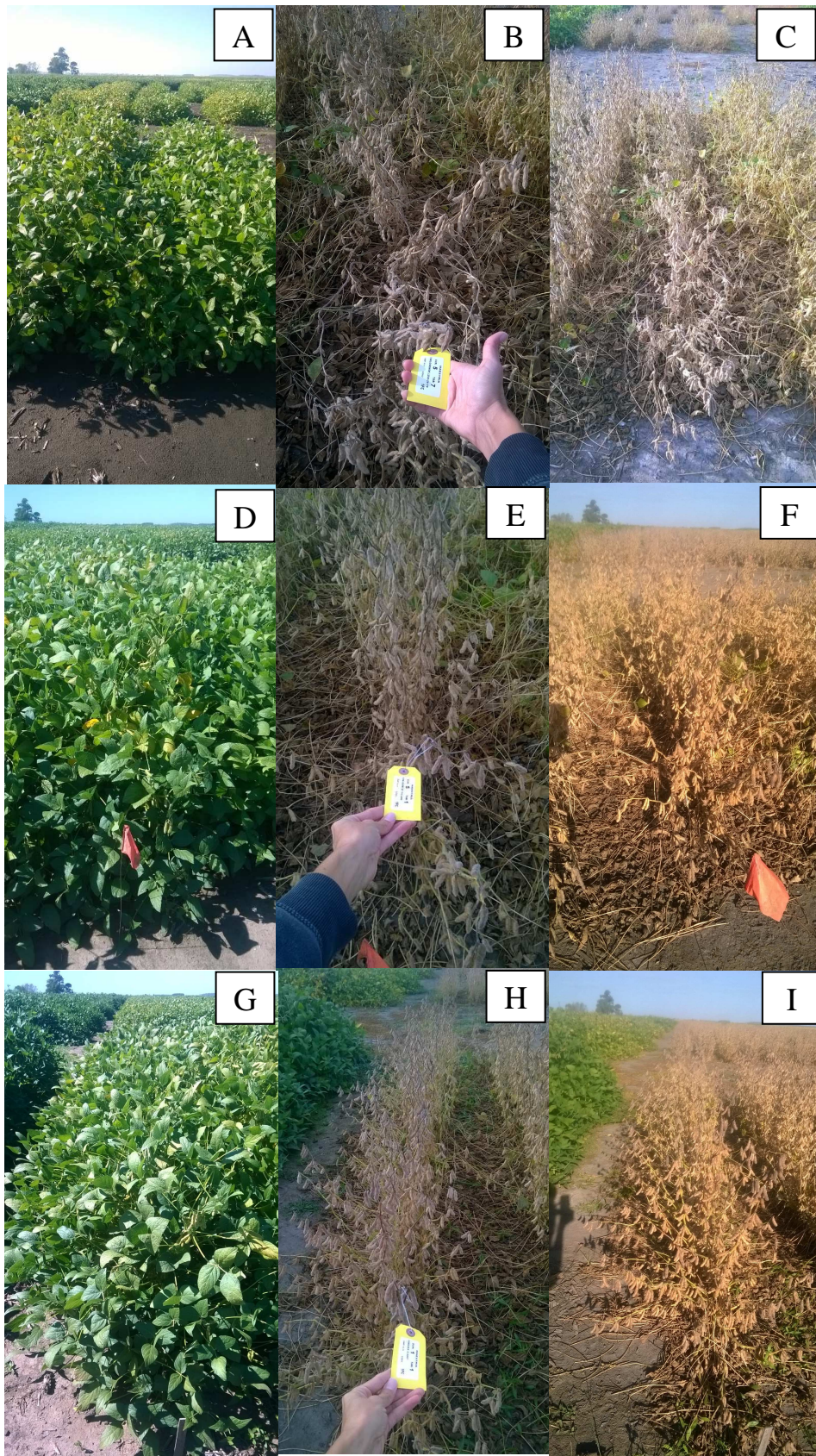
- Las evaluaciones fenotípicas confirmaron la resistencia de los individuos 99 y 100% similares al PR, ya que todos ellos obtuvieron un valor de 1 a 3 dentro de la escala comparativa con el patrón de susceptibilidad Lee 74.

- Las observaciones visuales de las poblaciones de individuos RC2F2 con mayor porcentaje de similitud al parental recurrente en la generación anterior (RC2F1), mostraron un parecido muy alto entre todas las progenies y el PR. En la Tabla 8 se presentan los datos fenotípicos tomados en el campo. En la Figura 46 se muestran fotos del parental Hartwig (donante de la resistencia) que evidencia este parecido. Tanto en la Tabla 8 como en la Figura 46, se puede apreciar el porte sin vuelco de individuos y PR a diferencia del PD.

**Tabla 8.** Datos fenotípicos de individuos de alta similitud con el parental recurrente y de ambos parentales.

Poblaciones RC2F2 derivadas de	GM	Flor	PUB	PF	HC	Hilo	Vuelco
RC2F1 94 %	45	Púrpura	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro	No
RC2F1 95 %	45	Púrpura	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro	No
RC2F1 96 %	45	Púrpura	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro	No
RC2F1 97 %	45	Púrpura	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro	No
R	45	Púrpura	Castaño claro	Castaño	Indeterminado	Negro	No
D	45	Púrpura	Gris	Castaño	Indeterminado	Negro imp.	Si

R: parental recurrente, D: parental donante. Progenies RC2F2 derivadas de poblaciones RC2F1 con un 94, 95, 96, y 97 % de similitud. GM: grupo de madurez, Flor: color de flor, Pub: color de pubescencia, PF: color de pared de fruto, HC: hábito de crecimiento.



**Figura 46.** Fotos del parental Hartwig, resistente a NQS (A, B, C); parental recurrente de la cruz 502 (R2) susceptible a NQS (D, E, F); y progenie de RC2F1 97% similar al padre recurrente de donde se obtuvieron los individuos RC2F2, 99 y 100% similares a éste último (G, H, I).

En la Figura 47 se muestra el parecido de individuos 100% similares al PR. En la Figura 47 se puede apreciar una leve tonalidad verdosa en el tallo del PD, menos ramificaciones en éste y mayor longitud de tallo, lo que genera su vuelco, a diferencia del PD y el individuo 100% similar elegido para la imagen.



**Figura 47.** Parentales donante, recurrente e individuo 100% similar al parental recurrente para los MM-SNPs evaluados

#### **F. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO (EER) EN MICROPARCELAS**

En la Tabla 9 se presentan los resultados de un ensayo preliminar de rendimiento, realizado en microparcels, de 3 metros de largo y 60 semillas totales, para el parental recurrente R2 (correspondiente a la cruz 502) y el promedio de dos de los individuos 100% similares al mismo, que portan el gen *rhg1* (R2-*rhg1*). Como cada microparcels se origina a partir de una planta no es posible contar con repeticiones para cada individuo en particular en esta instancia.

Tabla 9. Rendimientos promedio preliminares obtenidos en los ensayos de microparcels.

Variable	n	Media	E. E.	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
R2	2	5841,5	63,5	5778,0	5905,0
R2- <i>rhg1</i>	2	5809,5	984,5	4825,0	6794,0

R2: parental recurrente correspondiente a la cruza 502.

R2-*rhg1*: Individuos 100% similares a R2 portando el gen *rhg1*, de resistencia a *H. glycines*.

n: cantidad de individuos. E.E.: error estándar de la media.

## DISCUSIÓN

La cantidad de marcadores SNPs polimórficos resultantes por cruza específica luego del primer genotipado de parentales no superó el 50%, variando entre 30 y 50% de un total de 550 marcadores SNPs utilizados, seleccionados como los más polimórficos de un estudio previo de “fingerprint” que comprendía más del doble. Sumado a esto, la similitud entre el parental donante y cada uno de los parentales recurrentes fue superior al 50% en todos los casos, oscilando entre 58 y 62%. Aun así se puede observar en el árbol de la Figura 35 que el parental donante se ubicó en un grupo aparte respecto del total de recurrentes. La baja variabilidad genética observada para el grupo de genotipos utilizados en este estudio coincide con los informes sobre la escasa variabilidad existente dentro de los cultivares de la especie *G. max* que son el “pool” de genes disponibles para el mejoramiento (Miroslav *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003; Arnao *et al.*, 2010; Olsina *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; entre otros). Por otro lado, esto resalta la importancia del descubrimiento y disponibilidad de los SNPs, que permiten encontrar diferencias aún bajo las condiciones de base genética estrecha. La alta densidad de SNP en el genoma de la soja (y en el de otras especies) convierten a los MM-SNP en los más adecuados para este tipo de estudios, donde se necesitan muchos marcadores para conseguir la mayor cobertura posible del genoma (Gaur *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2004).

En el método de mejoramiento en el que nos enfocamos, la recuperación rápida del genoma del parental recurrente depende de varios factores, entre ellos la densidad y distribución de marcadores a lo largo del genoma de los parentales. Sin embargo no hay mucho conocimiento respecto a la cantidad mínima de marcadores a utilizar para la asistencia de una retrocruza. Como evidencias previas se pueden mencionar, entre otros, que Arnao *et al.* (2006) utilizaron 36 MM-SSR para recobrar el genoma de un parental recurrente en arroz (*Oryza Sativa*); Morris *et al.* (2003) emplearon 109 MM-SSR para un estudio comparativo de retrocruzas en maíz (*Zea mays*) y Faleiro *et al.* (2004) usaron 8 MM-RAPD para una retrocruza asistida en poroto común (*Phaseolus vulgaris* L).

Este estudio se inició saturando con 550 MM-SNP cada uno de los germoplasmas recurrentes y donante con la idea de hallar al menos 20 MM polimórficos entre ellos, resultando

en 202 y 196 SNPs polimórficos para las cruzas 502 y 503, respectivamente, distribuidos uniformemente en el genoma de la soja, con un promedio de 10 SNP en cada uno de los 20 cromosomas (Figura 33).

Por otro lado, al hacer uso para la detección del gen objetivo de un MM-SSR que tienen la característica de ser co-dominante, permitió llegar a individuos de alta similitud con el PR conteniendo el gen *rhg1* en estado homocigota, asegurando de esta forma la fijación de este gen en las variedades finales obtenidas.

Además, tras la primera retrocruza, los datos de similitud genética calculados para las progenies RC1F1 de ambas cruzas se situaron dentro de los valores esperados, siendo la similitud promedio de 75%. Luego de la segunda retrocruza el promedio de similitud esperado para el método tradicional (87.5%) fue superado por la progenie RC2F1 de la craza 502, que alcanzó un promedio de similitud de 89% con su respectivo parental recurrente. Sin embargo no ocurrió lo mismo para el caso de la progenie RC2F1 de la craza 503 en la que el promedio de similitud fue 83%, valor menor al esperado. Esto pudo deberse al bajo número de individuos (68) que se obtuvieron en esta generación, de los cuales solo 36 individuos (53%) contenían el gen de interés, *rhg1*.

Si se observan las curvas de distribución de similitud de ambas cruzas para la generación RC1F1 (Figs. 38 y 39), en las cuales se obtuvieron valores promedio esperados de 75% se observa claramente que cuando la cantidad de individuos obtenidos fue menor también cayó la cantidad de individuos con alta similitud genética obtenidos. Un bajo número de individuos con alta similitud dificulta la obtención de un buen número de individuos en la siguiente generación por tratarse estos de fuentes de flor para los sucesivos cruzamientos.

El número de individuos a lograr en cada generación y la estrategia de selección de los individuos que avanzan de una generación a la siguiente son otros de los factores importantes a tener en cuenta al hacer uso de este método, sin embargo tampoco existen demasiados registros que nos permitan asegurar una distribución adecuada de la similitud para el logro del éxito en la menor cantidad de generaciones. Frisch y Melchinger (2005) desarrollaron un modelo de selección teórica para retrocruzas asistidas por marcadores en la cual tuvieron en cuenta los tres factores mencionados y varios otros. Según estos autores, la selección es más eficiente a medida

que se incrementa el tamaño poblacional que con el aumento de marcadores utilizados, coincidiendo con lo sucedido en el presente trabajo.

Poner foco en conseguir rápidamente una alta similitud con el PR nos lleva a ejercer una mayor presión de selección en cada generación, eligiendo así pocos individuos con la más alta similitud para avanzar. Debería también investigarse qué sucede si disminuimos la presión de selección ejercida para avanzar, esto podría derivar en una distribución de similitud más amplia pero conteniendo al menos un individuo con la similitud deseada quedando solamente avanzar de generaciones: F1 y F2 para conseguir el objetivo final.

Al mismo tiempo, la mayor dificultad de la aplicación de este método es que se deben realizar ciclos sucesivos de cruzamientos, a los cuales se le suman dos muestreos y análisis encadenados antes de la floración, para poder aprovechar al máximo como donantes de cruza en cada generación a aquellos individuos que contengan el gen de interés y que a la vez tengan un alto porcentaje de similitud con el parental recurrente. Por lo tanto, reducir al máximo el número de ciclos de retrocruzas necesarias para la recuperación del genoma recurrente es altamente deseable para poder aplicar esta metodología en un programa de mejoramiento.

En las Figuras 44 y 45, que comparan la reducción del germoplasma donante y el aumento del germoplasma recurrente, respectivamente, se puede observar con claridad el resultado global obtenido a través de las generaciones para el método de retrocruza tradicional y el de retrocruza asistida por marcadores moleculares.

La generación a la que se llegó en este estudio, RC2F2 proveniente de progenies RC2F1 que comprendían valores de similitud de entre 94 y 97%, nos permitió constatar de forma visual la similitud fenotípica entre individuos resistentes y el PR. Se pudo observar alta similitud fenotípica en color de flor, color de pubescencia y pared de fruto, duración total de ciclo, hábito de crecimiento, color de hilo y comportamiento frente al vuelco (Tabla 8 y Figuras 46 y 47).

Además, los resultados del análisis preliminar de rendimiento en microparcels, presentados en la Tabla 9, dan una aproximación de la similitud en cuanto a rendimiento entre el parental recurrente y su respectiva progenie objetivo. Obviamente este dato en particular es solo orientativo y debe corroborarse en ensayos comparativos de rendimiento (ECR), con varias repeticiones y en distintas localidades. Estos ECR requieren de volúmenes de semilla superiores a los de una planta individual y por lo tanto serán realizados en una instancia de continuación, ya

que su concreción excede los límites temporales de esta tesis. No obstante estas limitaciones, se incluyeron los datos de rendimiento preliminar para mostrar hasta que instancia del proceso de mejoramiento se llegó, y el tiempo requerido para alcanzar la misma. En relación con esto, y a modo de sinopsis general, se presenta, en el **ANEXO 1**, la Tabla 10 con la cronología y el detalle de las actividades realizadas para incorporar resistencia al NQS en germoplasma elite de soja. En la Tabla 10 se puede apreciar que el proceso que va desde la siembra del bloque de cruzamientos original hasta la cosecha del ensayo de rendimiento preliminar de los individuos 100% similares al padre recurrente, con el gen de interés incorporado, se completó en dos años y nueve meses.

## **CONCLUSIÓN**

En este estudio se pudo demostrar que con sólo dos ciclos de retrocruzas y dos de avance generacional es posible obtener una población con un promedio de 97% de similitud genética con el parental recurrente, conteniendo individuos de 99 y 100% de similitud con la línea elite objetivo para los MM-SNPs evaluados. Además, utilizando el verano y la contra-estación se logró completar este objetivo en solo dos años, comparado con los cuatro años que llevaría lograr el mismo objetivo por el método de retrocruzas tradicional. A esto se le suma la reducción a menos de la mitad en los años de avance generacional para la fijación de genes. Asimismo, se redujo al mínimo el mayor inconveniente atribuido al método de retrocruzamiento, permitiendo su utilización eficiente en un programa de mejoramiento. Mantener las características de una línea elite y sumarle la introgresión de un gen de interés en el menor tiempo posible es lo que le aporta importancia al método de retrocruzamiento asistido por marcadores. Específicamente, en esta tesis se demostró que fue posible incorporar, en solo dos años y nueve meses, resistencia a NQS a germoplasma elite de soja sin perder las características agronómicas que lo hacen competitivo comercialmente. Tomados en conjunto, los resultados derivados del dominio de esta técnica tienen un alto potencial de aplicación para el mejoramiento genético de la soja.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acquah, G. (2009). Principles of plant genetics and breeding. John Wiley & Sons. Oxford, United Kingdom, 1er Edición.
- Afzali, A. J., Srour, A., Saini, N., Hemmati, N., El Shemy, H. A., & Lightfoot, D. A. (2012a). Recombination suppression at the dominant Rhg1/Rfs2 locus underlying soybean resistance to the cyst nematode. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (6), 1027-1039.
- Afzali, A. W., Srour, A., Natarajan, A., Saini, N., Iqbal, M. J., Geisler, M. & Lightfoot, D. A. (2012b). Resistance to Soybean Cyst Nematode: Rhg1. *Journal of Plant Genome Sciences*, 1 (2), p. 39-45.
- Agrios, G. N. (2005) *Plant Pathology*, 5th edn. Academic Press, San Diego, CA, USA, 5ta Edición.
- Alzate-Marin, A. L., Cervigni, G. D., Moreira, M. A., & Barros, E. G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (4), 333-342.
- Anand S. C. (1992). Registration of 'Hartwig' soybean. *Crop Science*. 32, 1069–1070.
- Anand, S. C., Matson, K. W., & Sharma, S. B. (1995). Effect of soil temperature and pH on resistance of soybean to *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 27 (4), p. 478.
- Arnao, E., Borges, O., Ramis, C., Díaz, A., & Galindo, I. (2006). Recuperación del genoma del padre recurrente en un programa de retrocruzas asistido por marcadores en arroz. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 31 (6), 431-436.
- Arnao, E., Perdomo R. y Graterol E. (2010). Diversidad genética en cultivares de soya utilizando marcadores microsatélites en Venezuela. *Interciencia*, 35 (7), 534-538.
- Assunção, M. S., Atibalentja, N. and Noel G. R. (2004). Soybean cyst nematode, *Heterodera glycine*, resistance genes in PI 89772 and PI 209332 soybean. *Nematropica* 34, 165-181.
- Baigorri, H., Serrano, R., Bacigaluppo, S., Boderó, M., Capurro, J., Gamudni, J., Lago, M., Lorenzatti, S., Magnano, L., Mendez, J., Giorda, L., Piatti, F., Chaves, E. y Cap, G. (1998). Detección del nemátodo del quiste en la región núcleo sojera argentina. En: *Actas de la Reunión Nacional de Oleaginosas*, 3, Bahía Blanca, Argentina, p. 67-68.

- Baenziger, P. S., and Hain, P. (2005). Advanced backcross breeding. Plant and Soil Sciences eLibrary, University of Nebraska – Lincoln, USA.
- Basheer-Salimia, R., Camilli, B., Scacchi, S., Noli, E., & Awad, M. (2014). Genetic Diversity among Palestinian Faba Bean (*Vicia faba* L.) Ecotypes based on Single Nucleotide Polymorphisms. European Journal of Horticulture Science, 79 (6), 300-305.
- Bergero, P. (2006). La cadena de la soja en Argentina, una de las más competitivas. P. 69-72. En: 3er Congreso de Soja del Mercosur, Conferencias plenarias, Foros y Workshops. Mercosoja.
- Bernardo R., Moreau L. and Charcosset A. (2006). Number and fitness of selected individuals in marker assisted and phenotypic recurrent selection. Crop Sci., 46, 1972-1980.
- Buso Cortopassi, C. S, Ciampi, A. Y., Carvalho Moretzohn M., Pedoreza, Z. y Vianello R. (2003). Maradores microssatelites em espécies vegetais. Biotecnologia. Ciencia y Desarrollo. P. 46-50.
- Byrne, P. and Richardson, K. (2005). Marker-assisted backcrossing for a single gene. Marker-assisted selection. Plant and Soil Sciences, eLibrary, University of Nebraska – Lincoln, USA.
- Cabi: Invasive Species Compendium (2015). Visible body: Heterodera glycines (soybean cyst nematode). Wallingford, UK. Recuperado de: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/27027>.
- Calzada, J. (2014). Comparación entre USA y Argentina: Áreas sembradas con cereales y semillas oleaginosas. Informativo semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario. AÑO XXXII - N° 1668 - 25 de Julio 2014.
- Cervigni, G. D. L., Schuster, I., de Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2004). Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. Euphytica, 135 (1), 99-105.
- Chen, S., Lin, X. H., Xu, C. G., & Zhang, Q. (2000). Improvement of bacterial blight resistance of Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. Crop Sci.40:239–244.
- Cregan, P. B., Mudge, J., Fickus, E. W., Danesh, D., Denny, R., & Young, N. D. (1999). Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the rhg1 locus. Theoretical and Applied Genetics, 99 (5), 811-818.

- Collins F.S., Brooks L.D., Charkravarti A., (1998). A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research*. 8, 1229-1231.
- Cornide, M. T. (2001). La genética vegetal, el mejoramiento y la sociedad. *Cultivos tropicales*. 22 (3), 73-82.
- Costilla, M. A. y Coronel, N. B. (1998). Presencia de nemátodos Heteroderidae en cultivo de soja en el noroeste argentino, con especial referencia al nemátodo del quiste *Heterodera glycines* Ichinohe. *Nematropica* 28, 124 (Resúmenes Annual Meetings of ONTA, 30, Mendoza, Argentina).
- Cubero, J.I. (2000). Historia de la Biotecnología Vegetal. Jornadas sobre productos transgénicos en Agricultura. ETSIAM. Córdoba, Argentino. Recuperado de:  
<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/cubero.htm>
- Cubero, J. I., (1999). Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Mundiprensa, Madrid, 365 pp.
- Cuniberti, M., Herrero, R., Vallone, S. y Baigorri, H. (2004). Calidad Industrial de la soja argentina. En: Proceedings of VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference y III Congreso Mundial de Soja (Brazilian Soybean Congress). Pp. 961-970.
- Davis, E. L., & Tylka, G. L. (2000). Soybean cyst nematode disease. Plant Health Instructor. APS, The American Phytopathological Society. USA. Recuperado de:  
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/SoyCystNema.aspx>
- Diamond, J. (2002). Evolution consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418, 700-707.
- Dias, W. P., Silva, J. F., Carneiro, G. E., Garcia, A., y Arias, C. A. (2009). Nematode de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. *Nematologia Brasileira*, 33, 1-16.
- Diers, B. W., Cary, T., Thomas, D., Colgrove, A., Niblack, T. (2010). Registration of LD00-2817P soybean germplasm line with resistance to soybean cyst nematode from PI 437654. *Journal of plant registrations*, 4 (2), 141-144.
- Distefano de Vallone, S. (2003). Enfermedades de soja. *Revista Idia XXI*, (INTA). N°3, Oleaginosas, p. 68-74.

- Doucet, M. E., Lax, P and Coronel, N. (2008). The soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe, in Argentina. In: Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Ciancio, A. and K. G. Mukerji (eds.), Springer. The Netherlands, pp. 127-148.
- Dougnac, G. M. Apuntes acerca de la historia de la soja en la Argentina. Elementos para delinear experiencias comparadas. Documentos del CIEA.
- Dubcovsky J. 2004. Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. *Crop Sci.*, 44, 1895-1898.
- Faleiro, F. G., Ragagnin, V. A., Moreira, M. A., & De Barros, E. G. (2004). Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. *Euphytica*, 138 (3), 213-218.
- Ferh, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., & Pennington, J. S. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L) Merrill. *Crop Science*, 11 (6), 929-933.
- Ferreira, M. F. D. S., Cervigni, G. D. L., Ferreira, A., Schuster, I., Santana, F. A., Pereira, W. D., & Moreira, M. A. (2011). QTLs for resistance to soybean cyst nematode, races 3, 9, and 14 in cultivar Hartwig. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46 (4), 420-428.
- Frankel, O. H. (1958). The dynamics of plant breeding. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*. 24, 112-123.
- Frisch, M., Bohn, M. and Melchinger, A.E. (1999a). Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Science*, 39:967-975.
- Frisch, M., Bohn, M., & Melchinger, A. E. (1999b). Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Science*, 39 (5), 1295-1301.
- Frisch M. and Melchinger A. E. (2001). Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Sci.*, 41, 1716-1725.
- Frisch M. and Melchinger A.E. (2005). Selection theory for marker assisted backcrossing. *Genetics*, 170, 909-917.
- Gamundi, J. C., Bodrero, M., y Lago, M. E. (2002). Nemátodo del quiste de la soja. *IDIA XXI Año II*, 3, 83-87.

- Gamundi, J. C.; Lago, M.; Capello, G.; Lenzi, L. y Bodrero, M. (2001). Relevamiento del Nemátodo del quiste de la soja *Heterodera glycines* en el sur de Santa Fe. Para mejorar la producción 11", Soja campaña 2000/01. EEA Oliveros.
- Ganal M.W., Altmann T., Röder M.S., (2009). SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 211-217.
- Giancola, S. I., Salvador, M. L., Covacevich M., Iturrioz, G. (2009), "Análisis de la cadena de soja en Argentina", Estudios socioeconómicos de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales. Número 3, INTA.
- Giorda, L. M., (1997). La soja en Argentina. In: Giorda L. M. and Baigorri (Eds.), El cultivo de la soja en la Argentina. INTA. Centro Regional Córdoba. (EEA Manfredi - EEA Marcos Juárez) Coordinación Subprograma soja. Editorial Editar, San Juan, Argentina, 11- 26.
- Guo-Liang Jiang (2013). Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants, *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, Prof. Sven Bode Andersen (Ed.), ISBN: 978-953-51-1090-3, InTech, DOI: 10.5772/52583. Available from: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding-from-laboratories-to-fields/molecular-markers-and-marker-assisted-breeding-in-plants>
- Guillín E., Gilli J. y Baigorri H. E. J. (2003). Frecuencia y Origen de alelos de Resistencia (*rhg1* y *Rhg4*) a *Heterodera glycines* en cultivares Argentinos de Soja. IV Simposio de Recursos Genéticos de América Latina y el Caribe. pp 45.
- Gupta, P. K., Rustgi, S. and Mir, R.R. (2008). Review. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity* 101, 5–18.
- Gaur, R., Azam, S., Jeena, G., Khan, A. W., Choudhary, S., Jain, M., & Bhatia, S. (2012). High-throughput SNP discovery and genotyping for constructing a saturated linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *DNA Research*, 19 (5), 357-373.
- Gurry, F. *et al.* (2011). Discurso de presentación. Simposio sobre el Fitomejoramiento para el futuro. Ginebra, Suiza, 5-6.
- Handoo, Z. A., & Anand, S. C. (1993). Biological manifestation of resistance to soybean cyst nematode development in 'Hartwig' soybean. *Crop Protection*, 12(5), 371-372.
- Hershman, D. E. (2015). Soybean cyst nematode (SCN) Management Recommendation for Kentucky. Plant Pathology Fact Sheet. University of Kentucky UK. P. 1-4.

- Hillel, J., Schaap, T., Haberfeld, A., Jeffreys, A. J., Plotzky, Y., Cahaner, A., Lavi, U. (1990). DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. *Genetics*, 124 (3), 783-789.
- Hyten, D. L., Choi, I. Y., Song, Q., Specht, J. E., Carter, T. E., Shoemaker, R. C., Cregan, P. B. (2010). A high density integrated genetic linkage map of soybean and the development of a 1536 universal soy linkage panel for quantitative trait locus mapping. *Crop Science*, 50 (3), 960-968.
- Hospital, F., Chevalet, C and Mulsant, P. (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics*, 132:1199-1210.
- Ivancovich, A., y Botta, G. (2003). Enfermedades de soja. Jornada Nacional de soja. Teatro Municipal de Mercedes Soriano. INTA La Estanzuela. Serie de Actividades de Difusión N° 325, 15-16.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., and Perry, R. (2013). Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14 (9), 946-961.
- Keim, P., Diers, B. W., Olson, T. C., & Shoemaker, R. C. (1990). RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics*, 126 (3), 735-742.
- Klink, V. P., Lawrence, G. W., Lawrence, K. S., & Matsye, P. D. (2013). Engineered soybean cyst nematode resistance. INTECH Open Access Publisher.
- Krapovickas A. (2010). The domestication and origin of agriculture. *Bonplandia* 19 (2), 193-199. ISSN: 0524-0476.
- Krapovicás A. (2005). La domesticación y el Origen de la Agricultura. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV) Trabajos del tomo LIX*, p. 238-247
- Kruglyak L. (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Natural Genetics*. 17, 21-24.
- Kwok P.Y., Deng Q., Zakeri H., Nickerson D.A. (1996). Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in apped STSs. *Genomics*. 31, 123-126.
- Landau-Ellis, D., and Pantalone, V. R. (2009). Marker-assisted backcrossing to incorporate two low phytate alleles into the Tennessee soybean cultivar 5601T. *Accounting Principles Fifth Canadian Edition*, 1, 316-318.

- Le Buanec, B. (2011). La evolución del fitomejoramiento y de la protección de las obtenciones vegetales. Simposio sobre el Fitomejoramiento para el futuro. Ginebra, Suiza. P. 12 – 22.
- Li, Y. H., Liu, Y. L., Reif, J. C., Liu, Z. X., Liu, B., Mette, M. F. & Qiu, L. J. (2014). Biparental resequencing coupled with SNP genotyping of a segregating population offers insights into the landscape of recombination and fixed genomic regions in elite soybean. *G3: Genes Genomes Genetics*, 4(4), 553-560.
- Lin, J. J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonald, M. H. & Matthews, B. F. (1996). Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14 (2), 156-169.
- Mahalingam, R., & Skorupska, H. T. (1996). Cytological expression of early response to infection by *Heterodera glycines* Ichinohe in resistant PI 437654 soybean. *Genome*, 39 (5), 986-998.
- Martínez, M. C., Helguera, M. y Carrera, A. (2010). *Biología y Mejoramiento Vegetal II. ARGENBIO*. Editores: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. Ediciones INTA. Parte I (5), 70-85.
- Matson, A.L. & L.F. Williams, (1965). Evidence of the fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode. *Crop Sci* 5, 477.
- Matsuo, É., Sedyama, T., Oliveira, R. D., Cruz, C. D., & Oliveira, R. D. C. T. (2012). Characterization of type and genetic diversity among soybean cyst nematode differentiators. *Scientia Agricola*, 69 (2), 147-151.
- Melchinger, A. E. (1990). Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding*, 104 (1), 1-19.
- Miralles, D. J. (2013). Estrategias para aumentar la producción de alimentos. *Ciencia Hoy* 134.
- Miroslav B, Miroslav K, Jana R, Miroslav V, Miroslav P (2002) Evaluation of genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr accessions included in the Czech National Collection of Soybean Genotypes. *Czech J. Genet. Plant Breed* 38, 69-74.
- Morris, M., Dreher, K., Ribaut, J. M., & Khairallah, M. (2003). Money matters (II): Costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. *Molecular Breeding*, 11 (3), 235-247.

- Niblack, T. L. (2005). Soybean cyst nematode management reconsidered. *Plant Disease*, 89 (10), 1020-1026.
- Niblack, T. L. (2003). Nematodes. *Illinois Agronomy Handbook*. Chapter 15, p 209-218.
- Niblack, T. L., Arelli, P. R., Noel, G. R., Opperman, C. H., Orf, J. H., Schmitt, D. P. & Tylka, G. L. (2002). A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 34 (4), 279.
- Noel, G. R. (1993). *Heterodera glycines* in soybean. *Nematologia Brasileira*, 17 (2), 103-121.
- Olazával, H. A. (2014). Los Orígenes de la agricultura: nuevos paradigmas. *Investigaciones Sociales*, 18 (33), 53-86.
- Olivero, G. y Lopez, G. (2010). *La agricultura Argentina al 2020. Fundación producir conservando*. Bs. As. Argentina. P. 1-44.
- Olsina, C., Cairo, C. y Pessino S. (2012). Desarrollo de una base de datos genéticos para la caracterización del germoplasma argentino de soja. *Ciencias Agronómicas - Revista XX - / 023 - 039*.
- Orrego Alzate, C. E., (2008). Congelación y Liofilización de alimentos. *Manizales, Caldas, Colombia*. Capítulo 2, 49-52.
- Osborn, Alan J., (1993). "Review of *The Origins of Agriculture and Settled Life* by Richard S. MacNeish. Norman and London: University of Oklahoma Press, 1992. 433 pages." *Anthropology Faculty Publications*. Paper 94.
- Pedroso, L. (2008). *Nemátodos del cultivo de soja en Paraguay*. Caacupe, Paraguay: Mag-Di-Ian/INBIO, p 8-21.
- Perez de la Torre, M. (2011). Análisis de la variabilidad genética mediante marcadores ISSR en *Calibrachoa* sp. p. 25-26.
- Prest, T. (2010). Backcrossing – Basics. *Genetic Technology Super Workshop* Ames, IA.
- Randhawa, H. S., Mutti, J. S., Kidwell, K., Morris, C. F., Chen, X., & Gill, K. S. (2009). Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection. *PLoS One*, 4(6), e5752.
- Rao-Arelli A. P., Anand S. C. and Wrather J. A. (1992). Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. *Crop Science*. 32, 862-864.

- Reyes-Valdés, M. H. (2000). A model for marker-based selection in gene introgression breeding programs. *Crop Science*, 40 (1), 91-98.
- Ridner, E. (2006). Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Buenos Aires, Arg. Grupo QSA: Sociedad Argentina de Nutrición. 96p.
- Riggs, R. D., & Schmitt, D. P. (1991). Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. *Journal of Nematology*, 23 (2), 149.
- Riggs, R. D., (1988). Races of *Heterodera glycines*. *Nematological Review. Nematropica*, 18 (2), 163-170.
- Riggs, R.D. (1982). Cyst nematodes in the Southern USA. In: *Nematology in the Southern Region of the United States* (Ed. by Riggs, R.D.), pp. 77-95. Cooperative Series Research Bulletin No. 276.
- Robbins, M. (2012). Inbred Backcross (IBC) Lines and Populations. America's research-based. Learning Network. <http://www.extension.org>.
- Rohlf, F. J. (2000). Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software, New York.
- Ruben, E., Jamai, A., Afzal, J., Njiti, V. N., Triwitayakorn, K., Iqbal, M. J. & Lightfoot, D. A. (2006). Genomic analysis of the *rhg1* locus: candidate genes that underlie soybean resistance to the cyst nematode. *Molecular Genetics and Genomics*, 276 (6), 503-516.
- Sala, C., Bulos, M., Fresco, A. y Altieri, E. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ARGENBIO*. Editores: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. Ediciones INTA. Parte III (3), 325-338.
- Sanz Pérez, B.; Herrera Castellón, E., Yuste Grijalba, F.J.; Haya Palazuelos, J., Krimperfort, L., Hernández Rodríguez, M., Riobó Serván, P., Jiménez Fernández, R. (2007). *La Salud y la Soja*. Grupo Leche Pascual, Editado por EDIMSA Editores Médicos S. A., Alsasua, Madrid. P 31-58.
- Saiz, F. (1980). Experiencias en el uso de criterios de similitud en el estudio de comunidades. *Arch. Biol. Med. Exp*, 13 (14), 387-402.
- Santana, H., Pires, E., Comerlato, A. P., Nasu, E. G., & Furlanetto, C. (2009). Variabilidade genética em populações de campo do nematóide de cisto da soja provenientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology*, 34, 261-264.

- Semagn, K., Bjornstad, Å. & Ndjiondjop, M. N. (2006). Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. *African Journal of Biotechnology*, 5 (25), 2589-2603.
- Shi, Z., Liu, S., Noe, J., Arelli, P., Meksem, K., & Li, Z. (2015). SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC genomics*, 16 (1), 314-319.
- Singh, G. (Ed.). (2010). *The soybean: botany, production and uses*. Edited by Guriqbal Singh. Department of Plant Breeding and Genetics Punjab Agricultural University Ludhiana, India. Parte III (15), 325 – 344.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Freeman, San Francisco. p. 136.
- Song, Q. J., Marek, L. F., Shoemaker, R. C., Lark, K. G., Concibido, V. C., Delannay, X., & Cregan, P. B. (2004). A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (1), 122-128.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2015). *World Agricultural Productions. Circular Series, WAP 8-15*, p. 20.
- Villarreal, Z. D., García, M., Colunga, P. (2008). El origen de la agricultura, la domesticación de plantas y el establecimiento de corredores biológico-culturales en Mesoamérica. *Revista de Geografía Agrícola*, Núm. 41, julio-diciembre, pp. 85-113 Universidad Autónoma, Chapingo México.
- Visscher, P.M., Haley, C.S. and Thompson. R. 1996. Marker-aided introgression in backcross breeding programs. *Genetics*, 144:1923-1932.
- Wang, J., Niblack, T. L., Tremain, J. W., Wiebold, W. J., Tilka, G. L., Marret, C. C., Noel, G. R., Myres, O. and Schmidt, M. W. (2003). Soybean cyst nematode reduces soybean yield without causing obvious aboveground symptoms. *Plant Disease* 87, 623-628.
- Wrather, J. A., Anderson, T. R., Arsyad, D. M., Tan, Y., Ploper, L. D., Porta-Plugia, A., Ram, H. H. and Yorinori, J. T. (2001). Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 115-121.
- Wrather, J. A. and Koenning, S. R. (2006). Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology* 38 (2) 173-18.

- Wrather, J. A., Shannon G., Balardin R., Carregal, L. et al. (2010). Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress*. [En línea]. DOI: 10.1094/PHP-2010-0125-01-RS.
- Winter, S. M. J., Rajcan, I., and Shelp, B. J. (2006). Soybean cyst nematode: challenges and opportunities. *Canadian journal of plant science*, 86 (1), 25-32.
- Wysmierki, F. T. (2010). *Contribucao genética dos ancestrais da soja as cultivares brasileiras*. Piracicaba. 99 p.
- Young, N. D. (1999). A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding*, 5 (6), 505-510.
- Zhu, Y. L., Song, Q. J., Hyten, D. L., Van Tassell, C. P., Matukumalli, L. K., Grimm, D. R. & Cregan, P. B. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 163 (3), 1123-1134.

## ANEXO 1

**Tabla 10.** Cronología de la incorporación de resistencia a NQS a germoplasma elite de soja mediante selección asistida por MM.

<b>Mes/Año</b>	<b>Actividad</b>	<b>Localidad</b>	<b>Lugar</b>
Dic. 2012	<b>BC.</b> Siembra del Bloque de Cruzamientos	Chacabuco	Campo DM
Ene. 2013	Muestreo de hojas de R2 y D	Chacabuco	Campo DM
Ene. 2013	Detección del gen objetivo ( <i>rhg1</i> ) con MM-SSR Satt309 Resultado: R2 sin y D con <i>rhg1</i>	Chacabuco	Lab. DM
Ene. 2013	Genotipado con 550 MM-SNP Resultado: 202 MM-SNP polimórficos entre R2 y D	Canadá	Lab. DNA Landmarks
Ene. 2013	Fenotipado para Raza 3 de NQS Resultado: R2 susceptible y D resistente	Brasil	Inv. DM
Ene. 2013	Cruzamientos R2 x D	Chacabuco	Campo DM
Abr. 2013	Obtención F1 (46)	Chacabuco	Campo DM
Jul. 2013	<b>1er RC.</b> Siembra R2 y 46 F1 obtenidas en Abril 2013	Chacabuco	Inv. DM
Ago. 2013	Muestreo de hojas de las 46 F1	Chacabuco	Inv. DM
Ago. 2013	Detección de gen objetivo ( <i>rhg1</i> ) con MM-SSR Satt309 Resultado: 43 F1 con <i>rhg1</i>	Buenos Aires	Lab. UBA-DM
Ago. 2013	Cruzamientos R2 x F1 con <i>rhg1</i>	Chacabuco	Inv. DM
Oct. 2013	Obtención de progenie RC1F1 (148)	Chacabuco	Inv. DM
Dic. 2013	<b>2da RC.</b> Siembra R2 y 148 RC1F1 obtenidas en Oct. 2013	Chacabuco	Campo DM
Dic. 2013	Muestreo de hojas de 148 RC1F1	Chacabuco	Inv. DM
Dic. 2013	Detección de gen objetivo ( <i>rhg1</i> ) con MM-SSR Satt309 Resultado: 74 RC1F1 con <i>rhg1</i>	Buenos Aires	Lab. UBA-DM
Dic. 2013	Genotipado 74 RC1F1 con 164 MM-SNP Resultado: 75 % similitud promedio entre RC1F1 y R2. Min. 65% y Max. 88%	Canadá	Lab. DNA Landmarks
Ene. 2014	Cruzamientos R2 x RC1F1 con <i>rhg1</i>	Chacabuco	Campo DM

*Continúa...*

**Tabla 10. Continuación**

<b>Mes/Año</b>	<b>Actividad</b>	<b>Localidad</b>	<b>Lugar</b>
Mar. 2014	Obtención de progenie RC2F1 (233)	Chacabuco	Campo DM
Mar. 2014	<b>Avance RC2F1.</b> Siembra 233 RC2F1 junto con R2 y D.	Arkansas	Campo DM
Jun. 2014	Muestreo de hojas de 233 RC2F1	Arkansas	Campo DM
Jun. 2014	Detección de gen objetivo ( <i>rhg1</i> ) con MM-SSR Satt309 Resultado: 109 RC2F1 con <i>rhg1</i>	Bs. Aires	Lab. UBA-DM
Jun. 2014	Genotipado 109 RC2F1 con 154 MM-SNPs Resultado: 89 % similitud promedio entre RC2F1 y R2. Min 77% y Max 97%.	Canadá	Lab. DNA Landmarks
Sep. 2014	Cosecha de progenie RC2F2 (109)	Arkansas	Campo DM
Nov. 2014	<b>Avance RC2F2.</b> Siembra progenie RC2F2 de las 16 RC2F1 de similitud entre 94 y 97 % con R2, junto con R2 y D	Chacabuco	Campo DM
Dic. 2014	Muestreo de hojas de 200 progenies RC2F2, derivadas de RC2F1 de 97% de similitud con R2	Chacabuco	Campo DM
Dic. 2014	Detección de gen objetivo ( <i>rhg1</i> ) con MM-SSR Satt309 de 200 muestras Resultado: 71 RC2F1 con <i>rhg1</i> en estado homocigota	Bs. Aires	Lab. UBA-DM
Dic. 2014	Genotipado 71 muestras con 120 MM-SNPs Resultado: 4 individuos RC2F2 de similitud 100% con R2	Canadá	Lab. DNA Landmarks
Ene.-Feb. 2015	Toma de datos fenotípicos a campo	Chacabuco	Campo DM
Mar. 2015	Cosecha de progenie RC2F2 (4) de similitud 100% con R2	Chacabuco	Campo DM
Abr. 2015	Fenotipado para Raza 3 de NQS de progenie RC2F2 (4) de similitud 100% con R2 Resultado: Resistencia a Raza 3	Chacabuco	Campo DM
May. 2015	<b>EER.</b> Siembra microparcels de RC2F2 100% R2 + <i>rhg1</i> (4), junto a parcelas R2	Arkansas	Campo DM
Sep. 2015	Cosecha de progenie RC2F3	Arkansas	Campo DM

BC: bloque de cruza; R2: Recurrente 2; D: Donor, Hartwig; NQS: Nemátodo del quiste de la Soja; MM: marcador molecular; SSR: microsatélites siglas en inglés; SNP: polimorfismo de nucleótido simple siglas en inglés; RC: retrocruza; Inv: invernáculo; Lab: laboratorio.

## ANEXO 2

**Tabla 11.** Listado de los 550 MM-SNP utilizados para el genotipado de los genotipos

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107927468	G610	1	7,349
ss107919439	G543	1	15,983
ss107920733	G251	1	16,723
ss107921288	G437	1	17,33
ss107913169	G574	1	29,884
ss107918851	G209	1	33,542
ss107928195	G289	1	37,143
ss107928136	G606	1	37,971
ss107914319	G518	1	39,921
ss107926972	G113	1	40,869
ss107930182	G259	1	41,58
ss107912776	G370	1	41,689
ss107928020	G582	1	43,745
ss107923139	G131	1	49,432
ss107914302	G544	1	52,713
ss107917765	G548	1	54,864
ss107913849	G377	1	58,03
ss107929868	G446	1	58,225
ss107913217	G273	1	59,786
ss107923585	G577	1	60,624
ss107923857	G547	1	64,675
ss107923832	G250	1	65,868
ss107912896	G248	1	77,066
ss107913795	G114	1	83,799
ss107913226	G585	1	91,319
ss4969672	G557	1	95,232
ss107915856	G343	1	97,287
ss107914779	G177	2	0
ss107921577	G656	2	0,947
ss107919808	G586	2	18,433
ss107918691	G334	2	18,801
ss107913471	G513	2	19,812
ss107923984	G237	2	21,459
ss107930839	G236	2	28,431
ss107915454	G605	2	29,984
ss107919176	G386	2	38,319

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107912779	G260	2	41,693
ss107916198	G428	2	44,246
ss107929550	G285	2	44,461
ss107923556	G625	2	45,028
ss107915294	G409	2	48,5
ss107913650	G540	2	50,246
ss107913651	G402	2	55,191
ss107921176	G460	2	55,561
ss107914852	G197	2	82,225
ss107914208	G206	2	83,356
ss107925463	G144	2	83,356
ss107927676	G489	2	83,384
ss107929621	G558	2	84,305
ss107918743	G358	2	85,835
ss107924971	G619	2	90,547
ss107913705	G620	2	94,879
ss107921498	G256	2	95,414
ss107916923	G572	2	103,895
ss107913160	G417	2	114,69
ss107918197	G115	2	116,494
ss107923892	G293	2	118,341
ss107913056	G125	2	119,19
ss107913946	G413	2	126,256
ss107913794	G579	2	131,851
ss107913418	G333	2	132,597
ss107923080	G191	3	12,532
ss107923073	G657	3	12,532
ss107918689	G274	3	13,404
ss107913534	G318	3	21,13
ss107913533	G556	3	22,033
ss107923492	G322	3	27,183
ss107930134	G637	3	27,429
ss107925790	G565	3	30,713
ss107930579	G192	3	37,468
ss107912787	G527	3	44,989
ss107916303	G661	3	45,589
ss107916895	G270	3	47,787
ss107913993	G492	3	49,693

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107916160	G529	3	50,429
ss107920850	G136	3	60,959
ss107913079	G390	3	61,481
ss107919246	G424	3	61,887
ss107913261	G304	3	62,615
ss107912585	G609	3	74,162
ss107912511	G444	3	81,043
ss107930750	G493	3	85,075
ss107914954	G369	3	85,18
ss107931012	G127	3	94,686
ss107920734	G385	3	95,842
ss107913512	G165	4	4,856
ss107919262	G190	4	5,442
ss107913342	G567	4	10,513
ss107919507	G473	4	14,034
ss107915399	G512	4	15,583
ss107917456	G449	4	43,508
ss107918688	G164	4	45,961
ss107929365	G660	4	51,667
ss107929343	G373	4	52,477
ss107921721	G649	4	52,477
ss107926381	G372	4	54,889
ss107921637	G156	4	59,692
ss107915692	G602	4	63,833
ss107912812	G411	4	63,834
ss107920542	G554	4	80,756
ss107915069	G365	4	100,565
ss107923986	G329	4	103,423
ss107916062	G207	4	105,842
ss107918301	G478	4	108,244
ss107921684	G188	5	0
ss107919814	G134	5	2,452
ss107923476	G328	5	3,449
ss107917197	G596	5	4,067
ss107913925	G387	5	6,866
ss107916344	G203	5	7,67
ss107913954	G653	5	9,483
ss107915802	G395	5	17,406

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107923021	G326	5	21,708
ss107920554	G628	5	22,524
ss107913008	G614	5	24,069
ss107926698	G117	5	27,639
ss107921358	G562	5	32,398
ss107912822	G283	5	32,896
ss107926653	G398	5	34,598
ss107923528	G545	5	34,778
ss107913817	G364	5	36,095
ss107923130	G592	5	37,896
ss107916669	G216	5	38,957
ss107923553	G419	5	41,627
ss107913883	G249	5	42,038
ss107918912	G271	5	47,268
ss107921710	G355	5	47,268
ss107920328	G262	5	49,474
ss107926859	G484	5	55,158
ss107919282	G593	5	56,137
ss107926849	G310	5	56,199
ss107919569	G168	5	57,945
ss107923047	G180	5	71,832
ss107919571	G555	5	72,963
ss107913271	G480	5	73,037
ss107926856	G623	5	77,959
ss107912834	G427	5	78,469
ss107926581	G308	5	80,633
ss107916759	G268	5	80,687
ss107926543	G421	5	80,687
ss107926845	G247	5	82,976
ss107913837	G204	6	5,196
ss107925232	G451	6	16,388
ss107913110	G468	6	26,077
ss107930217	G632	6	30,508
ss107913939	G307	6	36,765
ss107929454	G469	6	66,091
ss107912981	G124	6	67,988
ss107913501	G564	6	80,281
ss107914758	G404	6	86,271

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107921293	G163	6	88,142
ss107915519	G448	6	94,506
ss107918906	G235	6	97,061
ss107925029	G150	6	98,146
ss107929602	G459	6	98,146
ss107930961	G496	6	100,913
ss107929749	G535	6	100,941
ss107918865	G211	6	102,122
ss107924435	G135	6	103,109
ss107913818	G639	6	103,193
ss107922673	G266	6	103,198
ss107917089	G631	6	103,881
ss107923346	G363	6	104,504
ss107912725	G464	6	104,51
ss107928441	G645	6	106,335
ss107914315	G169	6	106,36
ss107917604	G281	6	107,007
ss107917577	G302	6	107,007
ss107917519	G202	6	107,007
ss107917113	G323	6	107,007
ss107914184	G438	6	113,054
ss107930040	G568	6	128,367
ss107929806	G161	6	129,529
ss107919937	G388	6	130,272
ss107920301	G578	6	132,849
ss107918678	G457	7	16,947
ss107930989	G375	7	39,074
ss107913778	G231	7	39,939
ss107912687	G151	7	45,128
ss107921552	G184	7	47,379
ss107929304	G507	7	48,211
ss107924009	G176	7	48,431
ss107915919	G405	7	48,838
ss107921198	G495	7	49,18
ss107913100	G612	7	50,249
ss107926222	G299	7	56,043
ss107928816	G346	7	56,043
ss107917285	G590	7	61,291

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107928876	G126	7	65,753
ss107915596	G331	7	65,876
ss107915510	G121	7	67,725
ss107925475	G282	7	70,761
ss107914845	G383	7	71,022
ss107914846	G502	7	71,558
ss107914681	G515	7	71,558
ss107912841	G294	7	71,558
ss107914547	G408	7	72,627
ss107928831	G280	7	74,407
ss107926274	G422	7	75,42
ss107913707	G242	7	75,843
ss107918199	G152	7	87,684
ss107912584	G416	7	127,897
ss107913340	G179	8	9,566
ss107912588	G222	8	14,613
ss107913692	G246	8	15,451
ss107930668	G401	8	21,016
ss107912616	G141	8	44,469
ss107915471	G186	8	46,416
ss107912766	G217	8	47,336
ss107912505	G498	8	47,557
ss107927408	G354	8	48,04
ss107930663	G532	8	51,348
ss107916610	G453	8	55,099
ss107913955	G630	8	55,108
ss107919549	G301	8	56,734
ss107918057	G482	8	56,878
ss107920652	G530	8	58,864
ss107916169	G440	8	59,302
ss107918483	G425	8	63,059
ss107918166	G566	8	70,116
ss107919652	G629	8	76,426
ss107918546	G349	8	77,062
ss107920189	G447	8	79,136
ss107913364	G481	8	81,247
ss107918751	G471	8	85,579
ss107912638	G314	8	85,599

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107927380	G391	8	89,495
ss107913321	G643	8	89,559
ss107919910	G587	8	90,755
ss107929468	G403	8	94,142
ss107926089	G539	8	99,803
ss107922986	G215	8	101,521
ss107925080	G456	8	102,181
ss107915613	G537	8	105,482
ss107927037	G347	8	107,556
ss107928306	G189	8	113,979
ss107913793	G291	8	113,979
ss107913452	G288	8	124,762
ss107913292	G600	8	128,798
ss107923475	G483	8	142,958
ss107912559	G255	9	5,329
ss107913820	G269	9	5,799
ss107924298	G407	9	6,863
ss107912624	G139	9	9,345
ss107927145	G356	9	9,345
ss107927867	G528	9	12,166
ss107922775	G129	9	14,419
ss107921298	G128	9	21,503
ss107924405	G546	9	23,331
ss107918132	G659	9	23,81
ss107916934	G118	9	35,093
ss107917237	G615	9	40,124
ss107926758	G298	9	40,126
ss107928776	G306	9	40,126
ss107926331	G458	9	41,311
ss107925455	G465	9	41,693
ss107923621	G142	9	41,87
ss107921320	G652	9	43,82
ss107920162	G382	9	43,82
ss107912828	G474	9	44,167
ss107928760	G147	9	44,858
ss107912830	G569	9	45,245
ss107924441	G311	9	45,719
ss107921711	G187	9	45,77

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107924931	G477	9	47,207
ss107913002	G533	9	47,384
ss4969768	G224	9	57,208
ss107920577	G159	9	60,041
ss107923460	G597	9	76,078
ss107922655	G584	9	77,44
ss107923059	G635	9	81,336
ss107918703	G617	9	84,99
ss107923267	G479	9	90,392
ss107922937	G324	9	93,753
ss107930584	G517	10	14,263
ss107919954	G154	10	36,588
ss107929517	G360	10	51,037
ss107928242	G263	10	51,569
ss107913582	G290	10	58,489
ss107927744	G205	10	64,956
ss107926354	G501	10	65,555
ss107912744	G286	10	94,973
ss107919004	G166	10	96,438
ss107915265	G122	10	99,685
ss107929516	G505	10	120,355
ss107919212	G595	11	4,578
ss107912613	G580	11	32,126
ss107913659	G277	11	32,136
ss107923942	G608	11	38,321
ss107913440	G133	11	45,373
ss107927406	G514	11	67,932
ss107922154	G624	11	76,856
ss107927357	G361	11	80,992
ss107919173	G267	11	109,489
ss107928908	G297	11	109,913
ss107920592	G357	11	110,169
ss107923799	G284	11	110,289
ss107920602	G531	11	111,022
ss107912802	G470	11	111,997
ss107921312	G252	12	6,175
ss107918051	G220	12	9,802
ss107919794	G561	12	10,766

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107923180	G434	12	14,621
ss107923407	G450	12	15,72
ss107912632	G240	12	26,913
ss107923325	G243	12	31,367
ss107924882	G591	12	31,715
ss107913327	G193	12	42,707
ss107924439	G487	12	45,175
ss107913253	G339	12	49,406
ss107912786	G490	12	56,137
ss4969584	G327	12	61,154
ss107913237	G172	12	62,005
ss107920464	G400	12	74,864
ss107912743	G218	12	78,391
ss107921722	G253	12	83,151
ss107914072	G148	12	87,327
ss107931019	G153	13	5,145
ss107930879	G435	13	12,508
ss107923007	G461	13	15,035
ss107930976	G181	13	19,157
ss107913916	G366	13	20,993
ss107912966	G622	13	28,209
ss107912827	G350	13	33,129
ss107928711	G174	13	34,843
ss107917514	G210	13	34,843
ss107917623	G199	13	35,01
ss107927778	G185	13	35,982
ss107929709	G167	13	36,697
ss107928790	G157	13	36,736
ss107912768	G521	13	44,849
ss107912810	G279	13	45,033
ss107917837	G381	13	49,32
ss107917485	G603	13	49,81
ss107929998	G175	13	52,218
ss107913658	G423	13	54,078
ss107918836	G576	13	56,609
ss107919896	G229	13	57,817
ss107924542	G650	13	61,354
ss107919342	G634	13	66,907

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107913720	G145	13	71,221
ss107918951	G519	13	71,893
ss107924336	G418	13	71,893
ss107913529	G227	13	75,921
ss107918333	G526	13	76,682
ss107913416	G503	13	78,335
ss107912991	G309	13	79,425
ss107919260	G315	13	96,91
ss107914645	G412	14	3,28
ss107912950	G534	14	4,936
ss107928907	G644	14	5,481
ss107926530	G499	14	7,882
ss107913527	G182	14	10,429
ss107912531	G276	14	11,514
ss107913540	G551	14	11,891
ss107927760	G642	14	12,589
ss107930533	G549	14	13,099
ss107930438	G553	14	15,332
ss107921725	G497	14	15,619
ss107916822	G312	14	21,727
ss107920676	G627	14	25,48
ss107927267	G213	14	35,521
ss107925149	G467	14	35,521
ss107923311	G330	14	55,5
ss107916333	G321	14	58,479
ss107914625	G601	14	80,364
ss107919846	G594	14	85,48
ss107918652	G509	14	86,181
ss107919596	G140	14	86,643
ss107912533	G374	14	97,923
ss107913414	G647	15	9,972
ss107919601	G335	15	18,773
ss107920164	G359	15	19,799
ss107918734	G538	15	27,2
ss107912650	G212	15	31,257
ss107918096	G264	15	33,181
ss107913472	G445	15	39,996
ss107917848	G414	15	47,9

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107913532	G367	15	57,236
ss107926612	G581	15	68,056
ss107926616	G138	15	68,056
ss107919271	G525	15	69,387
ss107926609	G389	15	69,692
ss107928260	G120	15	71,419
ss107929088	G379	15	74,805
ss107926118	G384	15	74,805
ss107924165	G462	15	75,942
ss107918717	G137	15	76,37
ss107923462	G655	15	76,596
ss107925412	G397	15	76,864
ss107928941	G196	15	76,873
ss107926229	G571	15	77,038
ss107929774	G542	15	77,406
ss107926941	G392	15	77,406
ss107922807	G380	15	77,485
ss107913808	G378	15	77,659
ss107913097	G287	15	77,862
ss107926496	G654	15	78,621
ss107920473	G116	15	79,229
ss107931005	G394	15	79,287
ss107922581	G208	15	80,371
ss107926703	G195	15	81,242
ss107924563	G194	15	82,277
ss107924416	G641	15	83,042
ss107913839	G431	15	84,934
ss107920392	G516	15	85,879
ss107930768	G541	15	86,323
ss107923135	G563	15	86,524
ss107913277	G226	15	86,643
ss107916986	G441	15	91,304
ss107913435	G132	15	93,416
ss107925861	G604	15	93,739
ss107925725	G442	15	94,148
ss107920030	G607	16	23,094
ss107919964	G155	16	23,797
ss107918800	G410	16	23,797

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107913888	G486	16	24,374
ss107923878	G173	16	25,768
ss107915515	G598	16	27,938
ss107916148	G583	16	38,622
ss107913499	G636	16	41,631
ss107912516	G494	16	41,814
ss107927483	G611	16	42,078
ss107912789	G626	16	42,358
ss107921448	G658	16	43,042
ss107926978	G371	16	44,521
ss107914604	G536	16	44,612
ss107913357	G475	16	46,063
ss107928839	G130	16	46,657
ss107927055	G376	16	47,279
ss107915042	G640	16	47,299
ss107920133	G171	16	62,957
ss107913908	G433	16	66,003
ss107927719	G228	16	67,74
ss107914377	G588	16	67,895
ss107929884	G265	16	71,559
ss107920273	G313	16	72,476
ss107920109	G485	16	73,898
ss107913640	G648	16	76,614
ss107920455	G325	16	81,413
ss107914365	G491	16	85,577
ss107927679	G178	16	85,841
ss107916235	G149	16	87,383
ss107918746	G292	16	87,575
ss107921385	G338	17	22,996
ss107926727	G336	17	32,99
ss107925594	G393	17	37,998
ss107923107	G362	17	38,553
ss107929993	G119	17	39,031
ss107921460	G560	17	41,551
ss107913739	G651	17	41,59
ss107914703	G618	17	59,916
ss107927195	G303	17	73,339
ss107928310	G123	17	77,388

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107922989	G368	17	86,022
ss107917944	G337	17	87,839
ss107921643	G257	17	109,308
ss107916176	G430	17	111,257
ss107927725	G488	17	113,896
ss107923378	G522	18	0
ss107918498	G396	18	0,923
ss107912513	G332	18	1,533
ss107916757	G344	18	8,117
ss107924634	G570	18	8,153
ss107912541	G230	18	9,131
ss107921443	G472	18	9,938
ss107921425	G613	18	9,939
ss107921439	G342	18	9,939
ss107914436	G295	18	9,957
ss107921628	G353	18	10,063
ss107921067	G599	18	26,922
ss107919731	G143	18	39,861
ss107929772	G429	18	43,918
ss107922867	G406	18	44,053
ss107912792	G241	18	44,925
ss107925785	G351	18	46,375
ss107921249	G455	18	48,948
ss107921158	G319	18	48,948
ss107927108	G345	18	48,948
ss107929627	G261	18	54,445
ss107928188	G245	18	54,445
ss107921212	G275	18	55,603
ss107921220	G616	18	55,603
ss107921211	G341	18	55,603
ss107926033	G348	18	55,603
ss107929290	G452	18	56,183
ss107924669	G633	18	59,994
ss107928522	G201	18	60,526
ss107915197	G426	18	64,255
ss107915182	G550	18	64,255
ss107919708	G476	18	69,503
ss107921608	G223	18	72,842

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107912619	G183	18	78,278
ss107912612	G305	18	79,403
ss107919928	G300	18	80,96
ss107921389	G162	18	86,585
ss107914021	G638	18	93,867
ss107929175	G646	18	97,315
ss107912598	G463	18	101,849
ss107926150	G272	18	103,109
ss107919550	G340	18	103,553
ss107913323	G214	18	104,215
ss107927865	G436	19	0
ss107927718	G552	19	0,091
ss107922594	G352	19	18,162
ss107926142	G559	19	27,382
ss107914393	G233	19	29,317
ss107928331	G296	19	32,773
ss107919958	G621	19	34,003
ss107913281	G317	19	35,779
ss107912667	G508	19	46,098
ss107928150	G160	19	48,449
ss107912586	G510	19	54,933
ss107913933	G520	19	55,881
ss107928000	G146	19	56,987
ss107927236	G170	19	56,987
ss107924889	G200	19	59,183
ss107915007	G239	19	61,475
ss107920660	G466	19	62,309
ss107919111	G320	19	74,759
ss107913069	G500	19	75,644
ss107913393	G420	19	76,541
ss107918727	G278	19	84,05
ss107914602	G225	19	90,442
ss107920153	G244	20	3,052
ss107925004	G506	20	11,353
ss107925746	G511	20	17,031
ss107925775	G254	20	17,135
ss107925739	G523	20	17,685
ss107923014	G238	20	19,964

*Continúa...*

<b>Nomenclatura</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Posición (cM)</b>
ss107926495	G443	20	37,561
ss107916725	G232	20	38,612
ss107915256	G219	20	41,895
ss107913138	G158	20	44,336
ss107912790	G439	20	49,925
ss107913269	G575	20	50,653
ss107913604	G399	20	50,849
ss107919422	G504	20	55,301
ss107913931	G258	20	85,381
ss107920342	G573	20	85,708
ss107920678	G234	20	88,643
ss107924319	G454	20	97,406
ss107927498	G316	20	100,02
ss107920141	G415	20	105,669
ss107914926	G589	20	106,088
ss107930001	G221	20	106,953
ss107929658	G432	20	110,087
ss107915149	G198	20	110,637
ss107921381	G112	20	111,275
ss107921664	G524	20	111,847