

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

Uso de germoplasma exótico para el mejoramiento de la
resistencia genética a factores bióticos que afectan el
cultivo de soja en Argentina

Javier R. GILLI

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2014

Uso de germoplasma exótico para el mejoramiento de la
resistencia genética a factores bióticos que afectan el
cultivo de soja en Argentina

Javier R. Gilli

Comisión Asesora de Tesis

Director: Dr. Diego O. Soldini

Asesores: Biol. Mgter. Laura Torres (codirectora)

Ing. Agr. M. Sc. Luis Salines

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Mario Buteler

Dr. Marcelo Doucet

Dr. Atilio Castagnaro

Presentación formal académica

junio de 2014

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

A mis compañeros de todos los días que han colaborado con predisposición en el desarrollo de este trabajo.

A los colegas del grupo de mejoramiento genético de soja del INTA Marcos Juárez que siempre han marcado el camino, especialmente a Diego y Luis.

En los últimos años he recibido apoyo y confianza de distintos grupos de investigadores lo cual me ha consolidado como investigador, agradezco a las personas que han hecho esto posible.

A Laura Torres por su predisposición y buena voluntad durante todas las instancias de este trabajo en las que he necesitado su ayuda.

A mis padres y hermanos, siempre son parte de mi crecimiento.

Especialmente a mi compañera de vida y a mis niños que me han enseñado a “poder ver más allá”.

*Poder transmitir caracteres adquiridos sería el mejor legado... dedicado a
mi familia, especialmente a mis niños*

Resumen

En Argentina la ganancia genética lograda en soja entre los años 1980 y 2000 fue de 14,3 Kg/ha/año, lo que representa el 62 % del incremento en rendimiento logrado en este período. Esto fue posible debido al uso de pocos cultivares genéticamente superiores como progenitores, lo que generó un estrechamiento en la base genética de la soja cultivada. El INTA, considerando este hecho como una debilidad para la sustentabilidad del cultivo, viene destinando recursos para combinar técnicas de biología molecular y mejoramiento genético a fin de revertir esta situación. En el presente trabajo se piramidaron genes para la resistencia a *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi* a través de retro-cruzamientos (RC) y selección asistida por marcadores moleculares (SAM). Para lograr este objetivo se utilizó germoplasma exótico con el doble propósito de obtener resistencia a factores bióticos y nuevas combinaciones exóticas de genes para caracteres de importancia agronómica. Se lograron dos generaciones anuales de retro-cruzamientos, sincronizando la floración entre grupos de madurez extremos lo que permitió el flujo génico entre estos. En la primer parte del proceso los genes de interés localizados en genotipos exóticos fueron transferidos a germoplasma adaptado a través de tres generaciones de RC usando SAM y selección fenotípica para la recuperación de los principales caracteres de adaptación del parental recurrente. En la segunda parte, se obtuvieron plantas dobles homocigotas para todas las combinaciones entre los tres genes de interés; la evaluación de las progenies de estas plantas en relación a los factores bióticos estudiados determinó que Satt288 es eficiente para la selección del gen *Rpp4*, mientras que se necesitan al menos dos marcadores moleculares (SCAR-tgmr o Satt009 y Satt641) para la selección del gen *Rps1-k*; además se confirmó que la resistencia a *Heterodera glycines* no depende exclusivamente de *Rhg4*, sin embargo la región genómica asociada a este gen fue incorporada a germoplasma adaptado. Como resultado final se obtuvieron plantas con resistencia combinada a *P. pachyrhizi* y *P. sojae* que poseen un nivel adecuado de adaptación y variabilidad exótica que será usada como base para la selección de líneas transgresivas para caracteres de importancia agronómica.

Palabras claves: marcadores moleculares, retro-cruzamientos, piramidación de genes

Abstract

Between 1980 and 2000 the genetic gain reached in soybean was 14,3 kg per hectare/year, which represents a 62 % increase in yield during this period. This is due to the little use of genetically superior crops as parent seeds, narrowing the genetics base of planted soybean. The INTA, considering this fact as a weakness for the crop's sustainability, has been spending resources in combining molecular biology techniques and genetic improvement in order to revert this situation. In the study presented here genes were ordered in a pyramid fashion for resistance against *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* and *Phakopsora pachyrhizi* through back-crossings (BC) and molecular marker assisted selection (MAS). To achieve this, exotic germplasm was used for the dual purpose of obtaining resistance to biotic factors and new exotic combinations of genes for traits of agronomic importance. Two annual generations of back-crosses were achieved by synchronizing the blooming stage between extreme maturing groups which allowed genetic flow amongst them. In the first part of the process the genes of interest, which were localized in exotic genotypes, were transferred to adapted germoplasm through three BC generations using MAS and phenotype selection for its recovery from the main traits of adaptation of the recurrent parent. In the second part, double homozygous plants were obtained for all combinations of the three genes of interest; the evaluation of the progeny of these plants in relation to biotic factors studied determined that Satt288 is efficient for the selection of *Rpp4* gene, while as for the selection of gene *Rps1-k* at least two molecular markers (SCAR-tgmr or Satt009 and Satt641) are needed; it was also confirmed that *Heterodera glycines* resistance does not depend exclusively on *Rhg4*, however the genomic region associated with this gene was incorporated to adapted germoplasm. As a final result plants with combined resistance to *P. pachyrhizi* and *P. sojae* that have an adequate level of adaptation and exotic variability were obtained to be used as the basis for selection of transgressive lines for traits of agronomic importance.

Tabla de Contenidos

Contenidos	Pág.
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas.....	X
Lista de abreviaturas.....	XII
Capítulo 1.....	1
Antecedentes	1
Mejoramiento genético.....	2
Marcadores moleculares en soja.....	3
Factores bióticos que afectan el cultivo de soja en Argentina.....	4
Problemas y Oportunidades	9
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
Capítulo 2.....	11
<i>Respuesta al fotoperiodo de distintos grupos de madurez y sincronización de la floración para dos ciclos anuales de retro-cruzamientos</i>	
Introducción	11
Objetivo	12
Materiales y Métodos	12
Cruzamientos a campo en período estival.....	12
Cruzamiento en invernáculo en contra-estación.....	15
Resultados y Discusión	16
Cruzamientos a campo en período estival.....	16
Regresión lineal simple.....	16
Análisis de varianza.....	19
Cruzamiento en invernáculo en contra-estación.....	22
Conclusiones	23

Capítulo 3.....	24
<i>Selección asistida con marcadores moleculares para los genes Rhg4, Rps1-k y Rpp4 en poblaciones de retro-cruzamientos</i>	
Introducción	24
Objetivo	27
Materiales y Métodos	27
Material vegetal.....	27
Marcadores moleculares.....	30
Grupo de ligamiento A2 (<i>Rhg4</i>).....	31
Grupo de ligamiento N (<i>Rps1-k</i>).....	31
Grupo de ligamiento G (<i>Rpp4</i>).....	31
Estrategia de selección.....	32
Resultados y Discusión	34
Caracterización de parentales.....	34
Esquema de selección.....	37
Etapa A.....	37
Etapa B.....	38
Etapa C.....	43
Selección de plantas homocigotas para los genes <i>Rhg4</i> , <i>Rps1-k</i> y <i>Rpp4</i>	48
Combinación de genes <i>Rhg4</i> y <i>Rpp4</i>	48
Combinación de genes <i>Rhg4</i> y <i>Rps1-k</i>	49
Combinación de genes <i>Rpp4</i> y <i>Rps1-k</i>	50
Conclusiones	52
Capítulo 4.....	53
<i>Evaluación fenotípica para la recuperación de los principales caracteres de adaptación del parental recurrente</i>	
Introducción	53
Objetivo	55
Materiales y Métodos	56
Resultados y Discusión	57

Análisis de conglomerados.....	57
Análisis del aspecto agronómico.....	59
Conclusiones.....	65
Capítulo 5.....	66
<i>Obtención de plantas doble homocigotas para las distintas combinaciones entre los genes Rhg4, Rps1-k y Rpp4 y evaluación de sus progenies frente a Heterodera glycines, Phytophthora sojae y Phakopsora pachyrhizi</i>	
Introducción.....	66
Selección molecular de plantas doble homocigotas.....	66
Evaluación de progenies para determinar la resistencia a los factores bióticos.....	67
Objetivos.....	70
Materiales y Métodos.....	70
Selección molecular de plantas doble homocigotas.....	70
Evaluación de progenies para determinar la resistencia a factores bióticos.....	70
Resultado y Discusión.....	72
Selección molecular de plantas doble homocigotas.....	72
Combinación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rpp4</i>	72
Combinación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rps1-k</i>	81
Combinación de genes los <i>Rpp4</i> y <i>Rps1-k</i>	88
Conclusiones.....	94
Conclusiones generales.....	95
Futuras líneas de trabajo.....	96
Bibliografía.....	97
Anexo 1.....	104
Anexo 2.....	107
Anexo 3.....	110
Anexo 4.....	117

Lista de Figuras

Contenido	Pág.
Capítulo 1	
Figura 1.1. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen <i>Rhg4</i> localizado en el GL A2 del mapa genético de soja.....	6
Figura 1.2. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen <i>Rps1-k</i> localizado en el GL N del mapa genético de soja.....	7
Figura 1.3. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen <i>Rpp4</i> localizado en el GL G del mapa genético de soja.....	9
Capítulo 2	
Figura 2.1. Regresión lineal para días a R1 (D/R1) y fechas de siembra (FS) agrupando grupos de madurez (GM).....	18
Figura 2.2. Regresión lineal para días a R8 (D/R8) y fechas de siembra (FS) agrupando grupos de madurez (GM).....	18
Figura 2.3. Comportamiento de los grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en las distintas fechas de siembra (FS) respecto al día óptimo de floración 0.....	21
Figura 2.4. Cruzamientos artificiales entre grupos de madurez extremos de soja en invernáculo de la EEA del INTA Marcos Juárez.....	23
Capítulo 3	
Figura 3.1. Esquema de mejoramiento genético para la piramidación de genes con selección asistida por marcadores moleculares en poblaciones derivadas de retro-cruzamientos.....	33
Figura 3.2. Fragmentos amplificados por los marcadores moleculares más ligados a los genes de interés en cada genotipo parental.....	36
Figura 3.3. Plantas caracterizadas con marcadores moleculares en cada ciclo de retro-cruzamiento para las tres regiones genómicas en estudio.....	43
Figura 3.4. Genotipo de las plantas RC _{3F2} caracterizadas.....	47
Capítulo 4	
Figura 4.1. Idiotipos identificados a través de la valoración visual del aspecto agronómico.....	60
Figura 4.2. Conglomerado obtenido por comparación entre veintisiete progenies derivadas de plantas RC _{3F2} y los genotipos parentales para los principales caracteres de adaptación en soja.....	61
Figura 4.3. Experimento a campo en el cual se observa el nivel de adaptación logrado en la generación RC ₃	64
Capítulo 5	
Figura 5.1. Esquema para la piramidación de tres genes usando poblaciones di-híbridas.....	69

Figura 5.2. Experimento en la EEA del INTA Cerro azul Misiones, donde se observa el envés de hojas de soja con distintos tipos de lesiones y los valores extremos del nivel de esporulación utilizado para la caracterización de las progenies.....	75
Figura 5.3. Experimento en invernáculo para evaluar la resistencia a la raza 3 de <i>H. glycines</i>	79
Figura 5.4. Reacción de progenies frente a la raza 3 de <i>P. sojae</i> a 5 días de la inoculación.....	84

Anexo 3

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt632 en plantas RC _{3F2}	111
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa MetaPhor al 3 % para AK-HSDS _{548/563} en plantas RC _{3F2}	111
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa MetaPhor al 3 % para STS-A2D8 en plantas RC _{3F2}	112
Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt424 en plantas RC _{3F2}	112
Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt159 en plantas RC _{3F2}	113
Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt009 en plantas RC _{3F2}	113
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % para SACAR-tgmr en plantas RC _{3F2}	114
Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt641 en plantas RC _{3F2}	114
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt505 en plantas RC _{3F2}	115
Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt288 en plantas RC _{3F2}	115
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt191 en plantas RC _{3F2}	116

Lista de Tablas

Contenido	Pág.
Capítulo 2	
Tabla 2.1. Cultivares comerciales estudiados	13
Tabla 2.2. Análisis de regresión lineal para días a R1 (D/R1) y días a R8 (D/R8).....	17
Tabla 2.3. Análisis de varianza de días a R1 (D/R1) para grupos de madurez (GM), fechas de siembra (FS) e interacción GM*FS.....	19
Tabla 2.4. Comparaciones múltiples (LSD - Fisher) entre grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en las fechas de siembra (FS) del 12 de diciembre y 2 de enero.....	20
Tabla 2.5. Valores promedios de parcelas en invernáculo de la EEA del INTA Marcos Juárez.....	22
Capítulo 3	
Tabla 3.1. Porcentaje de parental recurrente (PR) y donante (PD) en cada generación de retro-cruzamiento.....	27
Tabla 3.2. Características del germoplasma utilizado.....	29
Tabla 3.3. Tamaño en pares de bases (pb) de los marcadores moleculares en los genotipos patrones y su posición en el mapa genético de referencia.....	32
Tabla 3.4. Tamaño de alelos en pares de bases (pb) para cada marcador molecular en cada genotipo parental.....	36
Tabla 3.5. Semillas y plantas F ₁ obtenidas	38
Tabla 3.6. Cantidad de plantas RC _{1,2 y 3} obtenidas para cada gen en cada generación de retro-cruzamiento.....	38
Tabla 3.7. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC _{1, 2 y 3} para la región del GL A2 asociada al gen <i>Rhg4</i>	39
Tabla 3.8. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC _{1,2 y 3} para la región del GL N asociada al gen <i>Rps1-k</i>	40
Tabla 3.9. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC _{1,2 y 3} para la región del GL G asociada al gen <i>Rpp4</i>	41
Tabla 3.10. Composición alélica de las plantas RC _{3F2} seleccionadas para cada región genómica de interés.....	48
Tabla 3.11. Combinaciones entre plantas RC _{3F2} homocigotas para los genes <i>Rhg4</i> (GL A2) y <i>Rpp4</i> (GL G).....	49
Tabla 3.12. Combinaciones entre plantas RC _{3F2} homocigotas para los genes <i>Rhg4</i> (GL A2) y <i>Rps1-k</i> (GL N).....	50
Tabla 3.13. Combinaciones entre plantas RC _{3F2} homocigotas para los genes <i>Rps1-k</i> (GL N) y <i>Rpp4</i> (GL G).....	50
Tabla 3.14. Cantidad de plantas obtenidas y marcadores moleculares usados para la selección de los genes <i>Rhg4</i> , <i>Rps1-k</i> y <i>Rpp4</i> en las poblaciones de RC _{1,2 y 3} y RC _{3F2} ...	51

Capítulo 4

Tabla 4.1. Aspecto agronómico, idiotipo y grupo al que corresponde cada progenie y parental evaluado	62
---	----

Capítulo 5

Tabla 5.1. Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rpp4</i> y reacción de sus progenies frente a <i>H. glycines</i> y <i>P.pachyrhizi</i>	76
Tabla 5.2. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rpp4</i> frente a <i>P. pachyrhizi</i>	77
Tabla 5.3. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rpp4</i> frente a <i>H. glycines</i>	80
Tabla 5.4. Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rps1-k</i> y reacción de sus progenies frente a <i>H. glycines</i> y <i>P. sojae</i>	85
Tabla 5.5. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rps1-k</i> frente a las razas 1, 3 y 4 de <i>P. sojae</i>	86
Tabla 5.6. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rhg4</i> y <i>Rps1-k</i> frente a <i>H. glycines</i>	87
Tabla 5.7 Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rpp4</i> y <i>Rps1-k</i> y reacción de sus progenies frente a <i>P. pachyrhizi</i> y <i>P. sojae</i>	90
Tabla 5.8. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rpp4</i> y <i>Rps1-k</i> frente a <i>P. pachyrhizi</i>	91
Tabla 5.9. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes <i>Rpp4</i> y <i>Rps1-k</i> frente a las razas 1, 3 y 4 de <i>P. sojae</i>	92

Anexo 1

Tabla 1. Comparaciones múltiples (LSD - Fisher) entre grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en todas las fechas de siembra (FS).....	105
--	-----

Anexo 2

Tabla 1. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a <i>Rhg4</i>	108
Tabla 2. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a <i>Rps1-k</i>	108
Tabla 3. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a <i>Rpp4</i>	108
Tabla 4. Composición alélica de la plantas RC _{3F2} caracterizadas para cada región genómica de interés.....	109

Anexo 4

Tabla 1. Valores obtenidos de las progenies derivadas de plantas RC _{3F2} para caracteres de adaptación.....	118
--	-----

Lista de Abreviaturas

AA	aspecto agronómico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
cM	centimorgan
ECR	ensayos comparativos de rendimiento
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FCNR	fragmento cromosómico no recombinante
GL A2	grupo de ligamiento A2
GL G	grupo de ligamiento G
GL N	grupo de ligamiento N
GM	grupo de madurez
IH	índice de hembra
InDels	<i>Insertions-Deletions</i>
MM	marcadores moleculares
NQS	Nematodo del Quiste de la Soja
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	parental donantes
PR	parental recurrente
QTL <i>loci</i>	<i>Quantitative trait loci</i>
RAPD	<i>Random Amplified of Polymorphic DNA</i>
RC	retro-cruzamientos
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RH	reacción de hipersensibilidad
SAM	selección asistida por marcadores
SCARs	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STS	<i>Sequence Tagged Site</i>

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

La soja es originaria del este asiático y fue domesticada en el norte y centro de China, desde Asia fue introducida a Europa y luego a América, pero la verdadera expansión se produjo en EEUU en la década del 40 y en Sudamérica en la década del 70, principalmente en Brasil y Argentina.

La adaptación de la soja cultivada a los diferentes ambientes dependió en gran parte de tres factores: (a) la introducción de germoplasma para selección, para el uso como parentales en cruzamientos controlados o directamente para la producción comercial del grano (Hymowitz y Newell, 1981), (b) la comprensión de la respuesta al fotoperiodo de los distintos genotipos y (c) la aplicación de programas de hibridación cruzada y subsiguiente selección de líneas puras.

Unos 150 cultivares comerciales con amplia plasticidad adaptativa (Brim y Cockerham, 1961) fueron introducidos a Argentina principalmente desde EEUU, los cuales permitieron una exitosa difusión que favoreció el incremento drástico de los rendimientos unitarios de 1000 kg/ha a 2000 kg/ha entre 1977-1997.

El cultivo se extiende entre los 23° y 39° de latitud sur concentrándose el 91 % de la producción en la Región Núcleo (Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba) y el resto en las provincias del noroeste y del noreste.

En la actualidad la soja ocupa un lugar muy importante en la economía del MERCOSUR ya que los tres mayores productores son Brasil, Argentina y Paraguay, y producen en conjunto más del 46 % de la soja comercializada a nivel mundial.

Mejoramiento genético

En Argentina existen unos 10 criaderos de soja, en su mayoría privados, incluyendo el INTA y Universidades. La mayoría están orientados a mejorar el valor agronómico con la finalidad de elevar el potencial de rendimiento y reducir los costos de producción.

La ganancia genética (GG) lograda en Argentina entre los años 1980 y 2000, fue de 14,3 kg/ha/año lo que representa el 62 % del incremento en rendimiento logrado en este período, siendo el 38 % restante logrado por prácticas de manejo (Santos *et al.*, 2006).

El mejoramiento genético comercial de soja ha fomentado el uso intensivo de pocos cultivares genéticamente superiores como parentales, lo que ha producido un estrechamiento en la base genética de la soja cultivada (Specht y Williams, 1984).

Estudios moleculares de cultivares comerciales argentinos indican que se ha producido un cuello de botella genético entre los GM cortos (GM II, III y IV) y largos (V, VI, VII y VIII) (Ghione, 2011). Estos datos confirman la tendencia mundial respecto a la distribución de la variabilidad del germoplasma comercial de soja y demanda la necesidad de implementar hibridaciones entre GM extremos a fin de generar flujo genético entre estos.

Por otro lado la implementación de estrategias de mejoramiento base y la utilización de germoplasma no cultivado como actividad destinada a evitar la erosión genética capitalizando los genes de interés presentes en germoplasma exótico, no han sido empleadas por parte de los criaderos en Argentina. Esta situación plantea la necesidad de implementar un sistema dinámico que permita incorporar nuevos genes exóticos o combinaciones de estos al germoplasma comercial.

Marcadores moleculares en soja

El desarrollo de mapas de ligamiento y el uso de marcadores moleculares (MM) ha permitido manejar más eficientemente los recursos genéticos, optimizando el proceso de selección en los programas de mejoramiento genético.

Para el genoma de soja se dispone de un mapa genético con 20 grupos de ligamiento (GL) y 1849 marcadores moleculares, de los cuales 1015 son microsatélites (SSRs - *Simple Sequence Repeat*) (Cregan *et al.*, 1999). Además, 400.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) han sido depositados en el *GenBank* a partir de los cuales fueron desarrollados y localizados en el mapa de soja 5,550 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)/InDels (*Insertions-Deletions*) (Choi *et al.*, 2007). Finalmente, en enero de 2010 la integración del mapa físico y los mapas genéticos, permitieron ensamblar la secuencia completa del genoma de soja a nivel cromosómico (Schmutz *et al.*, 2010). Esta información está disponible en repositorios públicos como *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), o bases de datos como *Soybase* (Grant *et al.*, 2009) los cuales proveen a los usuarios herramientas para búsqueda y análisis de esta información.

Los marcadores SSR son secuencias de uno a cuatro nucleótidos repetidos en tándem que poseen la capacidad de mantener mutaciones generadas por azar, en el número de repeticiones de dichas secuencias, originando alelos múltiples. Esto se debe a que no están bajo ningún tipo de selección debido a que son marcadores neutros por no codificar proteínas. Además son marcadores co-dominantes lo cual permite identificar la composición alélica en poblaciones segregantes de mejoramiento y mapeo genético (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Dentro del genoma eucariota 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).

Los SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) y STS (*Sequence Tagged Site*) son MM derivados de RAPD (*Random Amplified of Polymorphic DNA*), AFLP

(*Amplified Fragment Length Polymorphism*) o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que han sido previamente asociadas a características de interés.

Los SSRs, SCARs y STS son marcadores que pueden ser reproducidos fácilmente en los laboratorios a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por tal motivo son muy utilizados para el mapeo de genes y la selección asistida por el uso de marcadores (SAM) en programas de mejoramiento genético.

Factores bióticos que afectan el cultivo de soja en Argentina

La sanidad del cultivo de soja en Argentina se ve afectada principalmente por hongos patógenos que se distribuyen en todas las áreas sojeras del país (Vallone y Giorda, 1997; Ivancovich *et al.*, 1999; Ploper, 1999; Formento y Daverio, 2001). Además, el nematodo del quiste de la soja (NQS) *Heterodera glycines*, junto con otras plagas son también causantes de importantes pérdidas económicas (Gamundi *et al.*, 2002; Vallone, 2002).

El incremento gradual de las enfermedades y plagas en el cultivo de soja está asociado al monocultivo, a las labranzas conservacionistas y la escasa variabilidad genética del germoplasma comercial, este hecho es evidente a partir de 1990 (Ploper, 1999).

En Argentina entre el 8 % y el 10 % de las pérdidas de producción se deben a las principales enfermedades y plagas (Vallone, 2002), entre ellas el NQS, nematodo de la agalla (*Meloidogyne incógnita* y *javanica*), cancro del tallo (*Diaporthe Phaseolorum f. sp. meridionalis*), podredumbre de raíz y base del tallo (*Phytophthora sojae*), mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*), muerte súbita (*Fusarium solani*) y roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*).

El uso de cultivares resistentes es una de las estrategias más utilizadas para el manejo sanitario de los cultivos (Allen, 1983) y debido a la co-evolución entre hospedantes y patógenos son seleccionadas nuevas variantes patogénicas que deben ser controladas con nuevos cultivares resistentes (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

La resistencia genética que expresan las plantas a distintas enfermedades puede ser controlada por la acción de un único gen (resistencia cualitativa), por la acción de muchos genes cada uno con efecto menor (resistencia cuantitativa) o por una combinación de ambos tipos (Burdon y Thrall, 2002). Sin embargo, en la mayoría de los casos la resistencia a enfermedades involucra un único gen (*R*) en la planta que corresponde específicamente a un único gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno (Flor, 1955). La susceptibilidad a la enfermedad resulta cuando se encuentra ausente ya sea el gen *R* de la planta o el gen *avr* del patógeno. En general un gen de resistencia específico defiende a la planta contra un patógeno específico (Gabriel y Rolfe, 1990). Esta interacción gen a gen dispara una o más vías de transducción de señales activando respuestas de defensa en la planta para prevenir el crecimiento del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996; De Wit, 1997).

Heterodera glycines: En el germoplasma comercial de EEUU cinco genotipos han aportado resistencia al NQS (PI 88788, PI 437654, Peking, PI 90763 y PI 209332) pero el 85 % de los cultivares comerciales poseen resistencia derivada de PI 88788 (Skorupska *et al.*, 1994). El genotipo PI 437654 posee resistencia a todas las razas del NQS (Anand y Gallo, 1984; Anand, 1985; Rao-Arelli *et al.*, 1992) y fue utilizado para la obtención del cultivar Hartwig (Anand, 1992) que combina los genes de resistencia *Rhg4* y *rhg1* (Webb *et al.*, 1995).

Estudios moleculares realizados en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Marcos Juárez indican que la resistencia al NQS en cultivares comerciales argentinos deriva principalmente de PI 88788 y en menor medida de Peking, nunca de PI 437654 o su derivado Hartwig (Guillin *et al.*, 2003).

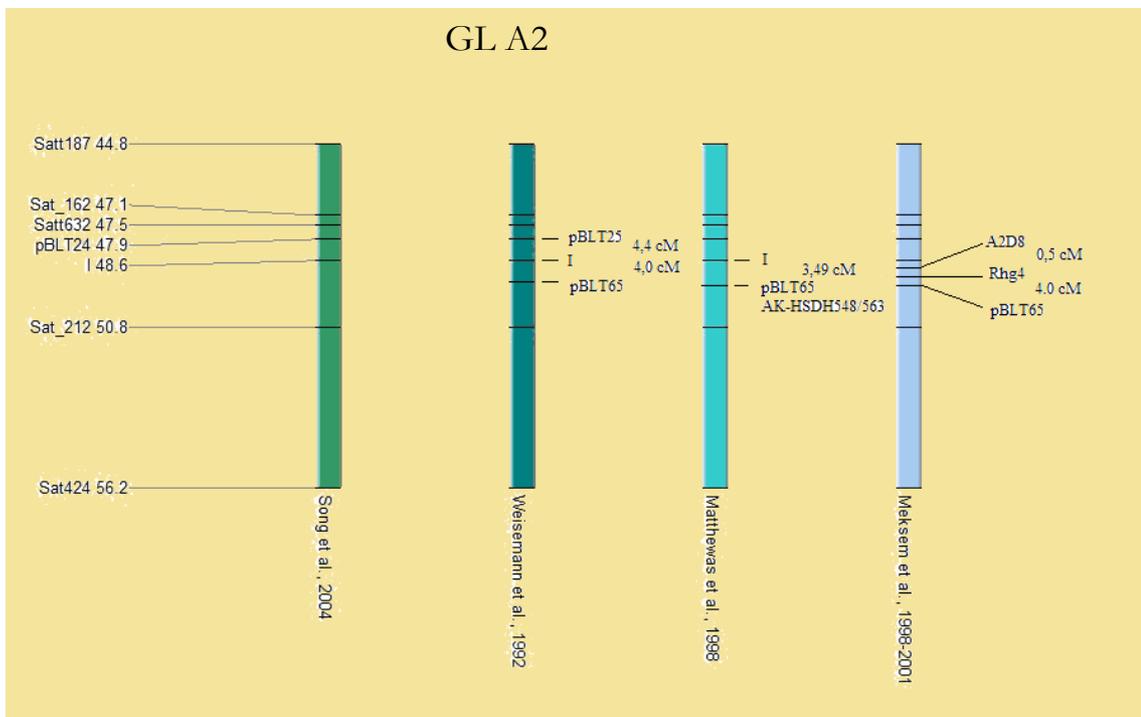
El gen *rhg1* es común entre las todas fuentes de resistencia conocidas y fue identificado como un gen recesivo (Rao-Arelli *et al.*, 1992) mientras que el gen *Rhg4* como dominante (Myers y Anand, 1991; Rao-Arelli *et al.*, 1992), ambos genes controlan la mayor proporción de la variabilidad para la resistencia a esta plaga en muchos cultivares (Meksem *et al.*, 1998).

El *locus Rhg4* fue localizado en el GL A2 estrechamente ligado al *locus i* el cual expresa el color del tegumento de la semilla (Matson y Williams, 1965) (Figura 1.1). Los marcadores RFLPs: pBLT65 y pBLT25 fueron mapeados a ambos lados del *locus i* a 4.0 y 4.4 centimorgan (cM) respectivamente (Weisemann *et al.*, 1992).

El Marcador pBLT65 es una porción del gen que codifica la enzima bi-funcional aspartokinase-homoserine dehydrogenase (Gebhardt *et al.*, 1999), a partir de esta secuencia fue desarrollado un marcador apto para uso en PCR (AK-HSDH_{548/563}) y localizado a 3,49 cM del *locus i* (Matthews *et al.*, 1998).

Además el marcador AFLP E_{CCG}M_{AAC}405 localizado a 0,5 cM del gen *Rhg4* fue utilizado para desarrollar otro marcador molecular denominado STS-A2D8 adaptado para amplificación por PCR (Meksem *et al.*, 2001).

Figura 1.1. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen *Rhg4* localizado en el GL A2 del mapa genético de soja.

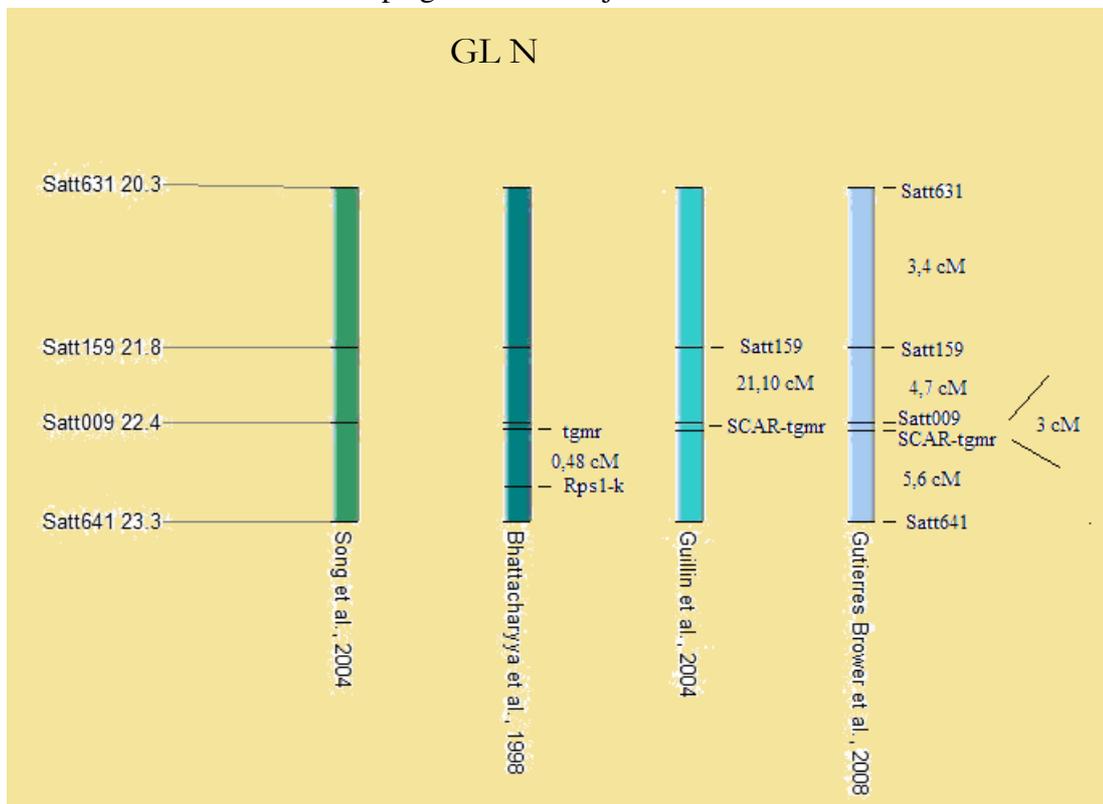


Phytophthora sojae: En el germoplasma de soja han sido reportados 14 genes que confieren resistencia a las diferentes razas de *P. sojae*, localizados en siete *loci* distintos del mapa genético de soja (Schmitthenner, 1985; Ward, 1990; Anderson y Buzzell, 1992; Förster *et al.*, 1994; Polzin *et al.*, 1994; Schmitthenner, 1999).

El gen *Rps1* posee seis alelos, de los cuales *Rps1-k* (Polzin *et al.*, 1994) expresa resistencia a 21 razas diferentes (Bernard y Cremeens, 1981) siendo el gen más importante para el control genético de esta enfermedad.

El alelo *Rps1-k* fue identificado originalmente en el cultivar Kingwa y luego transferido al cultivar Williams 82 (Bernard y Cremeens, 1981). Este gen fue localizado en el extremo distal del GL N del mapa genético de soja (Cregan *et al.*, 1999), en esta región genómica (Figura 1.2) fue detectado un retro-transposon estrechamente ligado a *Rps1-k* (Bhattacharyya *et al.*, 1997) y utilizado en el laboratorio de la EEA del INTA Marcos Juárez para desarrollar un marcador dominante (SCAR-tgmr) apto para uso en PCR, que co-segrega con la resistencia a *P. sojae* (Guillin *et al.*, 2004).

Figura 1.2. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen *Rps1-k* localizado en el GL N del mapa genético de soja.



Phakopsora pachyrhizi: Originalmente en el germoplasma de soja fueron descritos cuatro genes dominantes que expresan resistencia a la roya asiática de la soja (*Rpp1*, 2, 3 y 4) identificados en los genotipos PI 200492, PI 230970, PI 462312 y PI 459025, respectivamente (McLean y Bryth, 1980; Hartwig y Bronfield, 1983; Hartwig, 1986). Además fueron descritos los genes *Rpp5* y *Rpp6* localizados en los genotipo PI 200496 y PI 567102B respectivamente (García *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012) y un nuevo alelo del gen *Rpp1* denominado *Rpp1-b* (Chakraborty *et al.*, 2009).

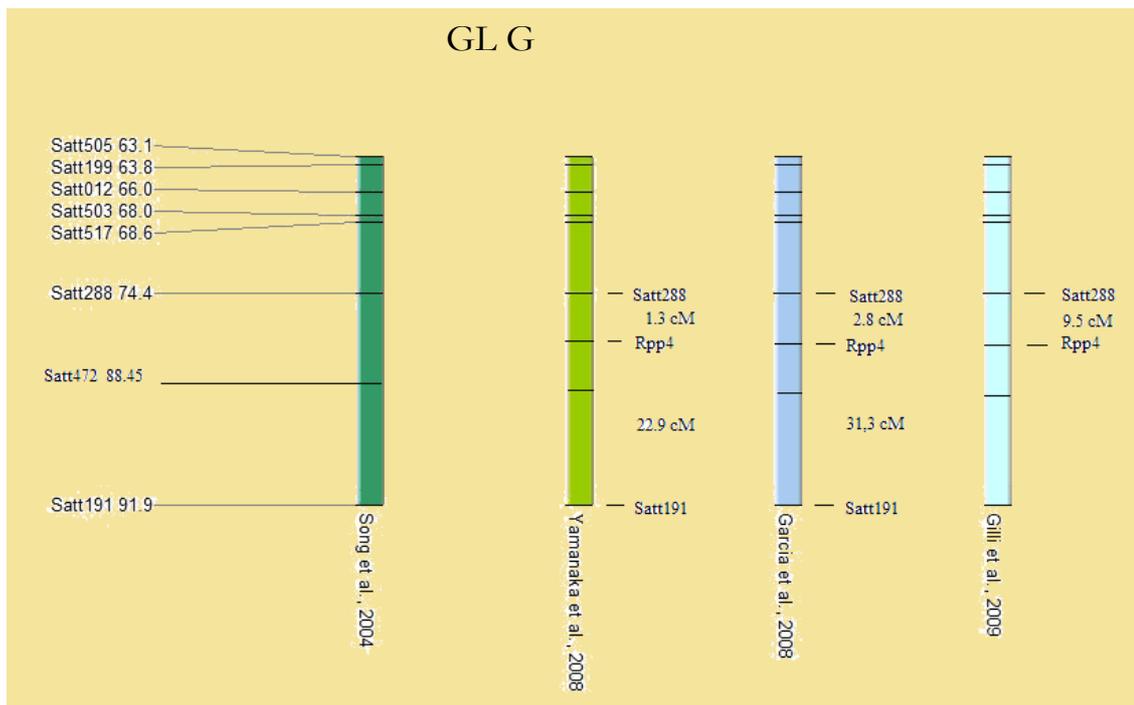
Los genes *Rpp1*, 2 y 4, fueron introducidos por retro-cruzamientos (RC₅) al cultivar susceptible Williams 82, originando las líneas L85-2378, L86-1752, L87-0482, respectivamente (Bernard *et al.*, 1991).

Todos los genes tienen la capacidad de expresar resistencia a través de la reacción de hipersensibilidad, mientras que solo en genotipos portadores de los genes *Rpp1* y *Rpp4* se identificó inmunidad para algunas variantes del hongo (Hyten *et al.*, 2007; Hartwig y Bromfield, 1983; Hartwig, 1986).

El gen *Rpp1* fue localizado en el GL G entre los marcadores Sct_187 y Sat_064 (Hyten *et al.*, 2007) y Satt191 y Sat_064 (Ray *et al.*, 2009), *Rpp2* en el GL J entre Sct_001 y Satt620 (Yamanaka *et al.*, 2008) y Satt215 y Sat_361 (García *et al.*, 2008), *Rpp3* en el GL C2 entre Sat_263 y Satt460 (Hyten *et al.*, 2009) y Satt307 y Satt460 (Monteros *et al.*, 2007), *Rpp5* en el GL N entre Sat_275 y Sat_280 (García *et al.*, 2008) y *Rpp6* en el GL G entre Satt324 y Satt394 (Li *et al.*, 2012).

El gen *Rpp4* localizado en el GL G entre los marcadores Satt288 y Satt191 del genotipo PI 459025 (Yamanaka *et al.*, 2008, García *et al.*, 2008) y Satt288 y Satt505 del genotipo L87-0482 (Gilli *et al.*, 2009) ha resultado efectivo para el control de esta enfermedad a través de sucesivas campañas agrícolas; en tanto que la resistencia del resto de los genes fueron quebradas por distintas variantes del hongo en Brasil (Yorinori *et al.*, 2005) y Argentina (Figura 1.3).

Figura 1.3. Comparación de cuatro mapas de ligamiento para la región del gen *Rpp4* localizado en el GL G del mapa genético de soja.



PROBLEMAS Y OPORTUNIDADES

En Argentina no se han encontrado referencias sobre el uso de germoplasma exótico para el desarrollo de germoplasma comercial o genotipos parentales. Este hecho representa una verdadera debilidad para la sustentabilidad del cultivo y requiere la implementación de métodos que permitan revalorizar el uso de los recursos genéticos nacionales como base para la obtención de genotipos elite. El INTA, considerando esta debilidad en el ámbito de la cadena soja y durante los últimos años viene destinando recursos para la adaptación de nuevas técnicas de biología molecular que junto a los métodos tradicionales de mejoramiento, permitan optimizar el uso de los recursos genéticos públicos disponibles en Argentina.

OBJETIVO GENERAL

Obtener genotipos de soja con genes derivados de germoplasma exótico para resistencia a *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi* a través de retro-cruzamientos y selección asistida por marcadores moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Sincronizar la floración entre grupos de madurez extremos para dos ciclos anuales de retro-cruzamientos.

- B. Seleccionar con marcadores moleculares los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* en tres ciclos de retro-cruzamientos y obtener plantas doble heterocigotas para las tres combinaciones posibles entre estos genes.

- C. Evaluar en un experimento a campo los principales caracteres de adaptación en progenies derivadas de plantas RC₃F₂.

- D. Obtener plantas doble homocigotas para las distintas combinaciones entre los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* y evaluar sus progenies frente a *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi*.

RESPUESTA AL FOTOPERÍODO DE DISTINTOS GRUPOS DE MADUREZ Y SINCRONIZACIÓN DE LA FLORACIÓN PARA DOS CICLOS ANUALES DE RETRO-CRUZAMIENTOS

INTRODUCCIÓN

La soja cultivada, *Glycine max* (L.) Merrill es una planta anual fotosensible de días cortos y con respuesta cuantitativa (Garner y Allard, 1920) lo que implica que cada genotipo posee un umbral o fotoperiodo crítico, y si estos son expuestos a fotoperiodos superiores la floración se retrasa. La clasificación más difundida del germoplasma de soja responde a la sensibilidad fotoperiodica, la cual separa a los genotipos en grupos de madurez (GM) que van de GM000 con requerimiento de fotoperiodos críticos largos, adaptados a altas latitudes, (Inouye *et al.*, 1979) hasta el GMX que florece con fotoperiodos críticos cortos, adaptados a los trópicos.

El germoplasma de soja posee un rango muy amplio de sensibilidad al fotoperiodo y cada GM está adaptado a una franja latitudinal de 200 km, lo cual implica que cada genotipo debe cultivarse en la época del año correcta para que la composición genética que posee, pueda expresar su máximo potencial de rendimiento de granos en campos de producción; en este sentido, Hartwig, (1970) sugirió que se necesitan al menos 45 días de crecimiento vegetativo, en condiciones de temperatura y humedad óptimas, para lograr un rendimiento de granos aceptable.

La diversidad de GM que posee el germoplasma de soja le ha permitido al cultivo adaptarse a diferentes latitudes, sin embargo para el mejoramiento genético esta característica es una barrera importante que limita el flujo de genes entre GM extremos. Como ya fue mencionado, estudios moleculares a nivel mundial y de germoplasma comercial argentino

confirman que la mayor variabilidad en la soja cultivada se encuentra entre GM extremos. Posiblemente este hecho se ha producido por la menor frecuencia de cruzamientos entre estos, debido a las diferencias en los tiempos de floración que ocurre entre genotipos de distintos GM para una misma latitud.

Tradicionalmente los programas de mejoramiento genético han utilizado distintas fechas de siembra (FS) para cruzar distintos GM, aparentemente esta estrategia no ha resultado eficiente, al menos entre GM extremos. Para el caso de los programas de mejoramiento base en los cuales se deben rescatar genes presentes en germoplasma exótico las diferencias en ciclo con el germoplasma comercial, representa un verdadero problema.

A fin de superar esta dificultad se ha utilizado invernáculo para la realización de cruzamientos en contra-estación (otoño-invierno), lo que facilita la sincronización de la floración entre los distintos GM debido a que los fotoperiodos cortos en esta época del año permiten manejar el inicio de la floración, suplementando el fotoperiodo natural con luz incandescente.

OBJETIVO

Sincronizar la floración entre grupos de madurez extremos para dos ciclos anuales de retro-cruzamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cruzamientos a campo en período estival

La EEA del INTA Marcos Juárez se encuentra ubicada a 32° 41' latitud sur y a 62° 09' longitud oeste, a 110 m sobre el nivel del mar. Para conocer el comportamiento fenológico de

los distintos GM para esta latitud y predecir las FS adecuadas para lograr dos ciclos anuales de retro-cruzamientos, se utilizó información disponible en el banco de datos estadísticos de soja del INTA Marcos Juárez. La misma corresponde a ensayos de catorce variedades comerciales de los GM II al VII (Tabla 2.1) en seis fechas de siembra realizadas entre los meses de septiembre y enero (1º: 8/9, 2º: 9/10, 3º: 14/11, 4º: 12/12, 5º: 2/1 y 6º: 17/1) durante las campañas agrícolas 2004/05 y 2005/06 en la EEA del INTA Marcos Juárez, considerando para el análisis las siguientes variables:

D/R1: Cantidad de días desde la siembra a R1¹;

D/R8: Cantidad de días desde la siembra a R8²;

Tabla 2.1. Cultivares comerciales estudiados.

Cultivares	Grupos de Madurez
DM2200	II
DM3100	III
DM3700	III
DM4200	IV
RAR418	IV
DM4600	IV
DM4870	IV
RAR514	V
TJ2055	V
A5766RG	V
N.Andrea66	VI
A6411RG	VI
A7321RG	VII
A7636RG	VII

¹ R1: Comienzo de floración. Una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal en el 50 % de las plantas de la parcela.

² R8: Madurez Fisiológica. Todas las vainas con color de madurez en el 50 % de las plantas de la parcela.

Se realizaron análisis de regresión lineal simple para las variables D/R1 y D/R8 en función de las distintas FS, utilizando el programa InfoStat, (2004) y el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 FS_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde

y_{ij} : variable respuesta, días a R1 (D/R1).

β_0 : constante que representa el valor de la variable respuesta cuando fecha de siembra (FS) es cero.

β_1 : pendiente de la recta de regresión que se interpreta como aumento de la variable respuesta por aumento unitario en la variable independiente o explicativa FS.

ε_{ij} : error aleatorio para la variable respuesta y_{ij} .

Además, se realizaron análisis de varianza utilizando la variable D/R1 para FS, GM e interacción FS*GM utilizando el programa SAS, (1989) y el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + GM_i + FS_j + GM * FS_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde

y_{ijk} : días a R1 observados para el i-ésimo grupo de madurez (GM), en la j-ésima fecha de siembra (FS).

μ : media general.

GM_i : efecto del i-ésimo grupo de madurez (GM).

FS_j : efecto de la j-ésima fecha de siembra (FS).

$GM * FS_{ij}$: efecto de la interacción entre el i-ésimo grupo de madurez y la j-ésima fecha de siembra.

ϵ_{ijk} : error aleatorio correspondiente a la observación y_{ijk} .

Se utilizó el método de comparaciones múltiples propuesto por Fisher (LDS Fisher) para la comparación de medias.

Cruzamientos en invernáculo en contra-estación

Por otro lado se usó la estrategia de siembra de invierno en invernáculo sometiendo a los genotipos a fotoperiodos extremadamente cortos lo cual induce la floración y permite sincronizarla, suplementando el fotoperiodo natural con luz incandescente.

A fin de ajustar el método de retro-cruzamientos en contra-estación, fue utilizado un invernáculo de vidrio equipado con un sistema de control automático de temperatura localizado en la EEA del INTA Marcos Juárez, donde se implantó un ensayo utilizando los parentales donantes (PD) de los genes de interés (Hartwig *Rhg4*, Williams 82 *Rps1-k*, L87-0482 *Rpp4*) y el parental recurrente (PR) NEM 3107. El ensayo fue sembrado el 10 de junio de 2007, el fotoperiodo fue extendido a 20 horas diarias utilizando luz incandescente hasta el 20 de agosto de 2007. En estas condiciones fueron analizadas las siguientes variables:

D/R1: cantidad de días desde la siembra a R1;

PAC: período de floración apto para cruzamientos¹;

A: altura de plantas en R1;

NN: número de nudos en R1;

¹ PAC: número de días que un genotipo está apto para ser cruzado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cruzamientos a campo en período estival

Regresión lineal simple

Las pendientes de regresión de las variables D/R1 y D/R8 fueron calculadas en función de las FS, juntando los GM y para cada GM de forma individual, cabe aclarar que los valores de FS fueron transformados a números julianos.

En la Tabla 2.2 se presentan los valores de R^2 y las ordenadas (Ord.) y pendientes (Pend.) para las variables D/R1 y D/R8. Se observa que juntando los GM los valores de R^2 para D/R1 y D/R8 son de 0,62 y 0,73 respectivamente, mientras que para el análisis individual de cada GM los valores varían entre 0,85 y 0,98, y 0,83 y 0,97 respectivamente.

En las Figuras 2.1 y 2.2 se presentan las pendientes calculadas juntando los GM, con valores de - 0,36 y - 0,57 para D/R1 y D/R8, respectivamente. Mientras que para los análisis individuales de GM los valores de las pendientes varían entre -0,28 y -0,42, y -0,47 y -0,63 para D/R1 y D/R8, respectivamente (Tabla 2.2).

Las pendientes negativas indican que a medida que se retrasa la FS se acorta el ciclo del cultivo, lo cual ya ha sido documentado por numerosos autores (Giorda y Baigorri, 1997). Este efecto producido por las FS en el germoplasma de soja y los valores obtenidos de R^2 indican que los datos analizados pueden ser utilizados para determinar las FS adecuadas para sincronizar el inicio de la floración de los GM II al VII.

Tabla 2.2. Análisis de regresión lineal para días a R1 (D/R1) y días a R8 (D/R8).

GM	Variable	N	R ²	Ordenada	Pendiente
Todos	D/R1	248	0,62	14554,56	-0,36
	D/R8	250	0,73	23122	- 0,57
II	D/R1	18	0,85	11512,38	-0,28
	D/R8	18	0,92	19020,09	- 0,47
III	D/R1	34	0,89	12459,18	-0,31
	D/R8	36	0,89	20939,56	- 0,51
IV	D/R1	70	0,88	12375,21	-0,30
	D/R8	72	0,92	23224,88	- 0,57
V	D/R1	54	0,96	16776,10	-0,41
	D/R8	52	0,93	23499,92	- 0,58
VI	D/R1	36	0,98	15277,12	-0,38
	D/R8	36	0,97	23716,31	- 0,58
VII	D/R1	36	0,97	17228,86	-0,42
	D/R8	36	0,83	25661,43	- 0,63

Figura 2.1. Regresión lineal para días a R1 (D/R1) y fechas de siembra (FS) agrupando grupos de madurez (GM).

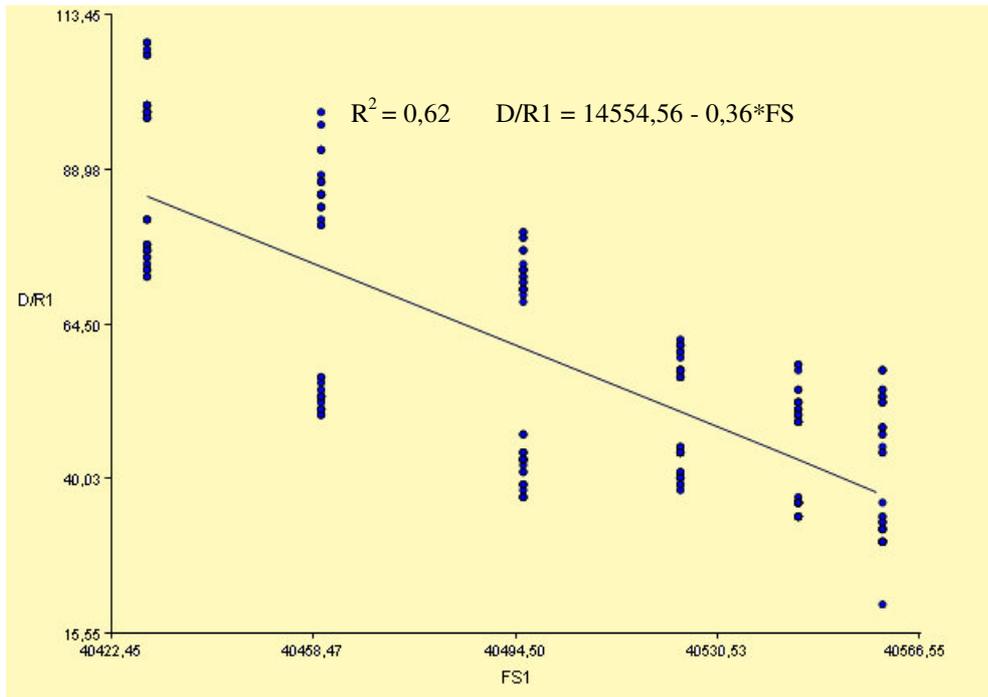
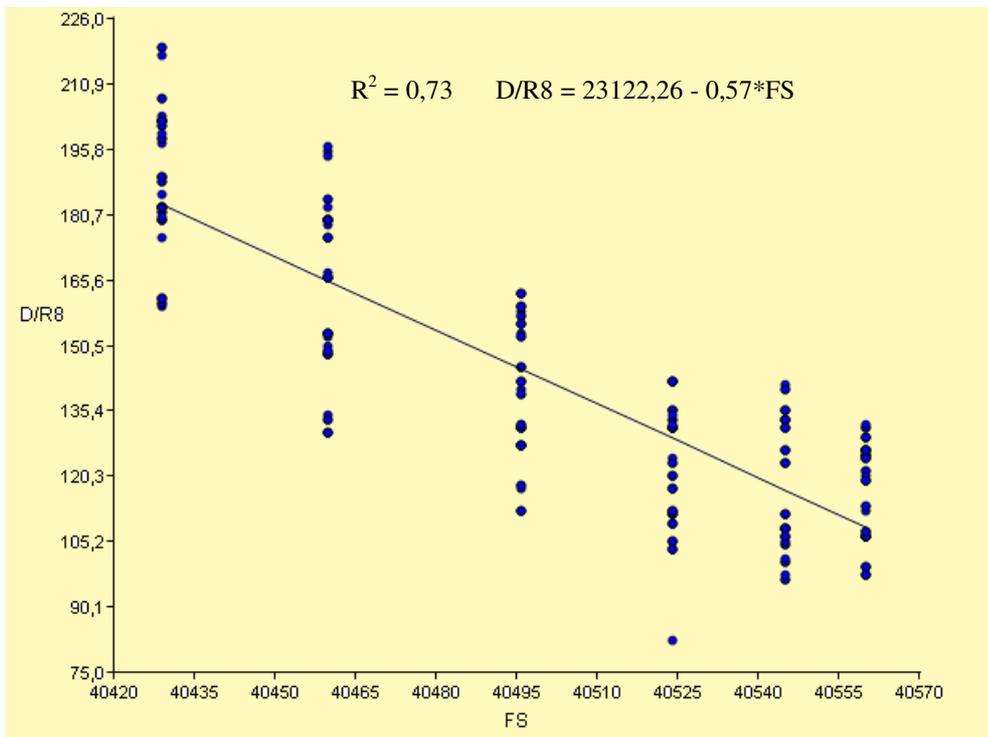


Figura 2.2. Regresión lineal para días a R8 (D/R8) y fechas de siembra (FS) agrupando grupos de madurez (GM).



Análisis de varianza

En la Tabla 2.3 se presenta el análisis de varianza de D/R1 para GM, FS y la interacción GM*FS. Los datos indican que existen diferencias significativas de D/R1 entre todos los GM y FS como así también para la interacción GM*FS.

Tabla 2.3. Análisis de varianza de días a R1 (D/R1) para grupos de madurez (GM), fechas de siembra (FS) e interacción GM*FS.

Efecto	GL-n	GL-d	F valor	Pr > F
GM	5	216	452.02	< 0.0001
FS	5	216	635.46	< 0.0001
GM*FS	25	216	11.82	< 0.0001

GL-n: grados de libertad del numerador; GL-d: grados de libertad del denominador.

A fin de conocer entre que FS se observan las menores diferencias de D/R1 entre los distintos GM se realizaron comparaciones múltiples para cada FS utilizando el método propuesto por Fisher (LSD-Fisher) (ANEXO 1).

Los resultados muestran que para D/R1 las FS del 12 de diciembre y 2 de enero fueron las que mostraron menores diferencias entre GM (Tabla 2.4). Entre los GM II, III y IV no se observaron diferencias significativas, mientras que el mismo comportamiento se observó entre los GM V, VI y VII excepto entre los GM V y VII sin embargo, el análisis mostró diferencias significativas entre GM extremos (entre cortos: GM II, III y IV y largos: GM V, VI y VII) para ambas FS.

Por otro lado las FS realizadas entre los meses de septiembre y noviembre son las que mostraron la mayor expresión de la diversidad de respuesta al fotoperiodo con mayores diferencias de D/R1 entre los distintos GM (Anexo 1).

Estos datos indican que las distintas FS son un factor determinante para la expresión de la diversidad genética que posee el germoplasma comercial argentino respecto a la

respuesta al fotoperiodo y a medida que se realizan siembras en fechas óptimas (septiembre - noviembre) se observan mayores diferencias entre los distintos GM, mientras que cuando las FS se alejan de fechas óptimas (diciembre – enero) lo distintos GM tienden a ser semejantes. Este efecto producido por la longitud del fotoperiodo durante el mes de diciembre y principios de enero puede ser aprovechado para sincronizar la floración entre genotipos de GM extremos en período estival.

Tabla 2.4. Comparaciones múltiples (LSD - Fisher) entre grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en las fechas de siembra (FS) del 12 de diciembre y 2 de enero.

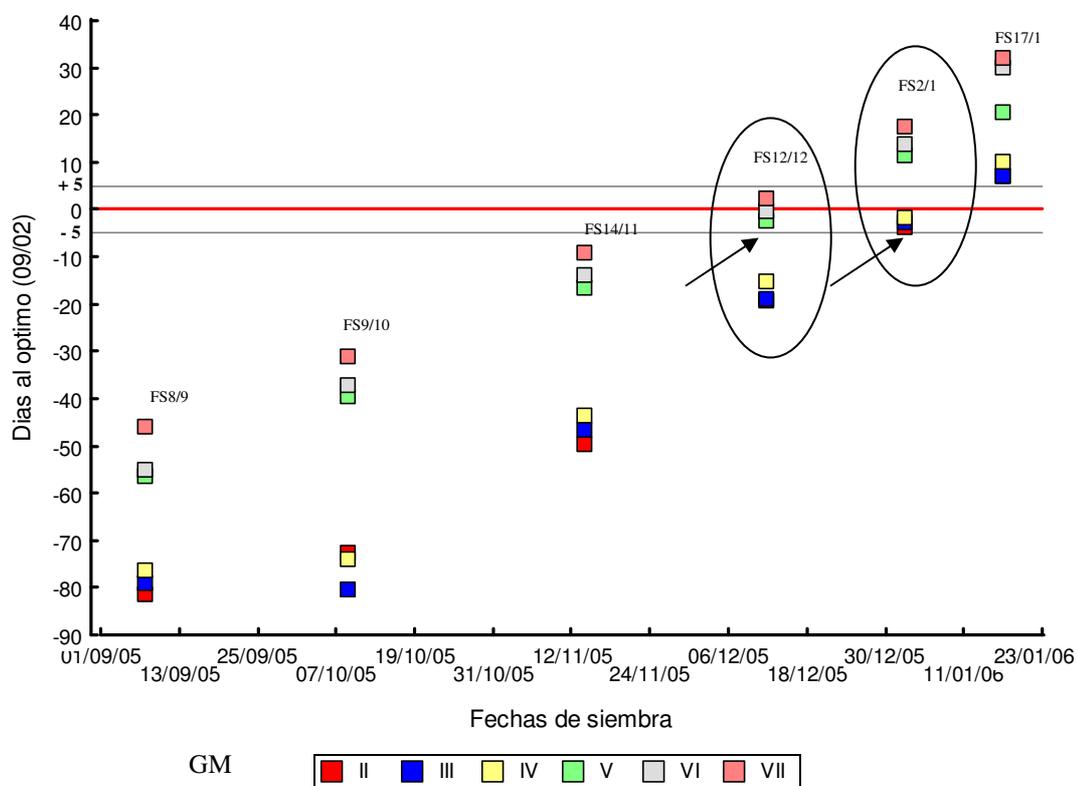
GM	FS	Estimado	Error	Grupo
VII	12/12	61.166	1.694	a
VI	12/12	58.333	1.694	ab
V	12/12	56.333	1.383	b
IV	12/12	43.500	1.198	c
III	12/12	39.833	1.694	c
II	12/12	39.667	2.396	c
VII	2/1	55.500	1.694	a
VI	2/1	51.500	1.694	ab
V	2/1	49.333	1.383	b
IV	2/1	36.083	1.198	c
III	2/1	35.000	1.694	c
II	2/1	34.000	2.396	c

Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$.

En la Figura 2.3 se muestra como los GM se comportan para la variable D/R1 en las distintas FS respecto al “día óptimo de floración 0¹” (DO) y se observa que los GM V, VI y VII de la FS del 12 de diciembre y los GM II, III y IV de la FS del 2 de enero muestran un rango de D/R1 de unos 10 días aproximadamente, que va desde - 5 a + 5 días del DO.

¹ El día óptimo de floración 0 (9 de febrero): fue calculado como el valor promedio entre D/R1 del GM II en la FS del 12/12 y D/R1 del GM VII en la FS del 2/1.

Figura 2.3. Comportamiento de los grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en las distintas fechas de siembra (FS) respecto al día óptimo de floración 0.



El análisis realizado demuestra que las FS realizadas en el mes de diciembre son adecuadas para sincronizar la floración entre genotipos de GM extremos los cuales florecen durante la primera quincena de febrero siendo el DO el 9 de febrero.

Debido a que los GM II y III desarrollan poca altura en R1 cuando son sembrados en estas FS y esto podría limitar la cantidad y calidad de flores, se utilizaron los genotipos de estos GM como donantes de polen (plantas macho), en tanto que los genotipos de GM IV, V, VI y VII) fueron usados como receptores (plantas hembras).

Por otro lado los cruzamientos obtenidos fueron recolectados al final del estadio R6¹ con el fin de lograr máxima calidad en las semillas cruzadas.

¹ R6: vainas con semillas verde que llena la cavidad.

Cruzamientos en invernáculo en contra-estación

Se realizó un experimento en condiciones controladas de invernáculo con el fin de conocer el comportamiento fenológico de los genotipos Hartwig, Williams 82, L87-0482 y NEM 3107. Los datos se obtuvieron a partir de plantas individuales y en la Tabla 2.5 se presentan los promedios para cada genotipo y variable de interés. Los valores observados para D/R1 mostraron que el inicio de la floración para todos los genotipos se produjo en un período de 4 días, entre el 1 y 5 de septiembre, siendo NEM 3107 el genotipo más precoz y L87-0482 el más tardío.

Por otro lado se observó que el período apto para la realización de cruzamientos varió entre 15 y 20 días. Durante todo el ciclo del cultivo la temperatura fue de 20°C a 38°C, en estas condiciones las plantas lograron altura de 180 a 200 centímetros y de 18 a 25 nudos (Figura 2.4).

Tabla 2.5. Valores promedios de parcelas en invernáculo de la EEA del INTA Marcos Juárez.

Genotipos	D/R1	PAC (días)	A (centímetros)	NN
Hartwig	86	15	180	20
Williams 82	85	20	200	18
L87-0482	88	15	180	25
NEM 3107	84	15	200	22

D/R1: cantidad de días desde la siembra a R1; PAC: período de floración apto para cruzamientos; A: altura de plantas en R1; NN: número de nudos en R1.

Estos datos indican que, en condiciones de invernáculo los genotipos de GM extremos sembrados durante el mes de junio y sometidos a fotoperiodos de 20 hs durante 72 días pueden ser cruzados en la EEA del INTA Marcos Juárez.

Figura 2.4. Cruzamientos artificiales entre grupos de madurez extremos de soja en invernáculo de la EEA del INTA Marcos Juárez.



CONCLUSIONES

La sincronización de la floración entre GM extremos se logró realizando la siembra durante el mes de diciembre para condiciones en época estival y junio en contra estación con control del fotoperiodo. La implementación de esta estrategia permitió el flujo de genes entre GM extremos generando variabilidad genética y agilizando el proceso de retro-cruzamientos.

SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES PARA LOS GENES *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* EN POBLACIONES DE RETRO-CRUZIAMENTOS

INTRODUCCIÓN

Los MM han sido utilizados en programas de mejoramiento genético como herramientas para la selección de plantas en poblaciones de cría (Tanksley y Rick, 1980; Beckmann y Soller, 1983; Burr *et al.*, 1983; Ribaut y Hoisington, 1998, Tanksley *et al.*, 1989) con el fin de seguir el rastro de los genes de interés, acelerar la recuperación del genoma recurrente (Hospital *et al.*, 1992) y evitar el arrastre de genes adyacentes a aquellos de interés, que puedan afectar negativamente el valor agronómico del genotipo seleccionado (arrastre por ligamiento) (Babu *et al.*, 2004).

Además, el uso de MM ha optimizando y agilizando el proceso de piramidación de genes eliminando la interacción genotipo-ambiente, permitiendo la selección de genotipos en estadios tempranos y detectando alelos recesivos enmascarados en genotipos heterocigotas (Collard *et al.*, 2005).

Algunos autores han desarrollado estrategias para optimizar el uso de MM en la piramidación de genes, uno de los más relevantes es el trabajo de Bertrand *et al.* (2004) quienes desarrollaron un algoritmo que permite calcular la duración del proceso de mejoramiento en término de número de generaciones y el costo en termino de tamaño de poblaciones usando tres esquemas distintos de cruzamientos, uno en cascada y dos en pirámide invertida aplicando SAM, pero sin considerar como resultado final la obtención de germoplasma adaptado.

Para los casos en los que se desea piramidar genes exóticos y obtener como producto final parentales para los programas de mejoramiento o germoplasma comercial el método de retro-cruzamientos propuesto por Harlan y Pope, (1922) sigue siendo el más adecuado ya que produce como resultado, genotipos que pueden ser probados directamente en ensayos comparativos de rendimiento (ECR) a campo. El método consiste en usar un genotipo agrónomicamente adaptado (PR) y cruzarlo con un genotipo portador del gen de interés (PD) que es generalmente exótico (Sleper y Shannon, 2003). Las progenies obtenidas son cruzadas con el PR por varias generaciones y en cada ciclo de RC se selecciona el gen de interés y se reduce a la mitad el aporte del parental donante, por lo tanto si el número de RC es n la proporción de genoma recurrente será de $1 - (1/2)^{n+1}$ (Fehr, 1987) (Tabla 3.1).

Este método es ampliamente utilizado en la conversión de genotipos susceptibles a resistentes para enfermedades de importancia agronómica que son controladas por genes con efectos mayores (Allard, 1960). Sin embargo la necesidad de realizar de 6 a 7 generaciones para recuperar más del 99 % del PR (Fehr, 1987; Stam y Zeven, 1981; Tanksley *et al.*, 1989) a fin de obtener como resultado un genotipo idéntico a este, son condiciones que desalientan el uso de este método como rutina en los programas comerciales de mejoramiento de soja debido principalmente a la incompatibilidad con las estrategias comerciales.

Por otro lado resultados teóricos (Stam y Zeven, 1981) y experimentales (Young y Tanksley, 1989) muestran que incluso en las generaciones de RC avanzadas el segmento del PD alrededor del gen de interés es de un gran tamaño y podría arrastrar caracteres no deseados del parental exótico (Zeven *et al.*, 1983), en este sentido en programas de RC en los cuales se considera posible este efecto la cantidad de plantas necesarias para romper este ligamiento podría ser muy elevado.

Considerando que la distancia de ligamiento entre *locus* medida en cM se calcula en base a la frecuencia de recombinación y si se dispone de un mapa genético con distancias entre los *locus* de una región de interés, estas pueden ser usadas para estimar el tamaño de la

población necesaria para obtener simples o dobles recombinantes a fin de evitar el arrastre por ligamiento (Tanksley *et al.*, 1989). En este sentido, mientras menor es la frecuencia de recombinación entre dos *locus* menor es la distancia de ligamiento entre ellos y mayor deberá ser el tamaño de la población para romper este ligamiento.

Como fue mencionado por Bertrand *et al.* (2004) una parte importante del costo económico para el uso de MM es la cantidad de individuos necesarios que se deben caracterizar para encontrar un genotipo deseado. En adición a este concepto y considerando que las regiones genómicas alrededor de los genes pueden mantenerse estables hasta generaciones avanzadas de RC (Zeven *et al.*, 1983) se propone piramidar los genes aprovechando estos fragmentos cromosómicos no recombinantes (FCNR) alrededor de los genes, ya que no hay antecedentes que indiquen la presencia de genes desfavorables en las regiones genómicas que serán piramidadas en este trabajo. Esta estrategia permite asegurar la selección del gen en una población de tamaño reducido ya que los FCNR segregan como factores mendelianos por ausencia de recombinación.

En este sentido se puede determinar el tamaño óptimo de los FCNR considerando el número mínimo de individuos necesarios para piramidar dos o más factores mendelianos.

Como ejemplo se puede mencionar el caso de una población F_2 di-híbrida en la cual se desea seleccionar un genotipo doble homocigota, en este caso el tamaño mínimo de la población requerida es de 16 individuos mientras que, el tamaño del FCNC deberá ser de 6 cM para que no se produzcan recombinantes en el mismo.

Tabla 3.1. Porcentaje de parental recurrente (PR) y donante (PD) en cada generación de retro-cruzamiento.

Generación	% PR	% PD
F ₁	50	50
RC ₁	75	25
RC ₂	87,5	12,5
RC ₃	93,7	6,25
RC ₄	96,8	3,12
RC ₅	98,4	1,60
RC ₆	99,2	0,80

OBJETIVO

Seleccionar con marcadores moleculares los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* en tres ciclos de retro-cruzamientos y obtener plantas doble heterocigotas para las tres combinaciones posibles entre estos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la obtención de plantas F₁ y RC, los genotipos Hartwig, Williams 82 y L87-0482 fueron utilizados como parentales donantes de los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4*, respectivamente y el genotipo NEM 3107 como parental recurrente (Tabla 3.2).

El genotipo Hartwig desarrollado en EEUU fue el primer cultivar con resistencia a todas las razas del NQS derivada del PI 437654 y se comporta como un genotipo de GM VI para las condiciones agroecológicas de Argentina.

El genotipo Williams 82 también fue desarrollado en EEUU y es un cultivar de GM III ampliamente utilizado en nuestro país como parental en programas de mejoramiento por su

aptitud combinatoria, buena adaptación a nuestras condiciones agroecológicas y por poseer el gen *Rps1-k* que confiere resistencia a un amplio rango de razas de *P. sojae*.

La línea L87-0482 derivada del cultivar Williams 82 posee el gen *Rpp4* del genotipo PI 459025 incorporado por retro-cruzamientos, el cual confiere resistencia a *P. pachyrhizi*.

Por último el genotipo NEM 3107 es una línea pre-comercial de GM V y hábito de crecimiento indeterminado con buen comportamiento al vuelco, pertenece al programa de mejoramiento genético del INTA y es resistente al cancro del tallo. Este genotipo ha sido estudiada en ECR durante las últimas tres campañas agrícolas en tres localidades de la región pampeana húmeda.

Tabla 3.2. Características del germoplasma utilizado.

PR	PD	GM	CF	CP	HC	Objetivo	Gen	MMA	GL
NEM 3107		V	P	M	I	Fondo Genético	-	-	-
	Hartwig	VI	B	M	D	<i>H. glycines</i>	<i>Rhg4</i>	STS-A2D8 (Meksem <i>et al.</i> , 2001)	A2
	L87-0482	III	B	M	I	<i>P. pachyrhizi</i>	<i>Rpp4</i>	SSR-Satt288 (García <i>et al.</i> , 2008)	G
	Williams 82	III	B	M	I	<i>P. sojae</i>	<i>Rps1-k</i>	SCAR-tgmr (Guillin <i>et al.</i> , 2004)	N

PR: parental recurrente; PD: parentales donantes; GM: grupo de madurez; CF: color de flor (P: púrpura – B: blanca); CP: color pubescencia (M: marrón – G: gris); HC: habito de crecimiento (I: indeterminado – D: determinado); MMA: marcador molecular asociado al gen de interés; GL: grupo de ligamiento.

Marcadores moleculares

El ADN fue obtenido mediante el método de CTAB (Murray y Thompson, 1980) utilizando muestras de tejido foliar de plántulas de cada genotipo parental y progenie correspondiente. La calidad y cantidad de ADN fueron determinadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en Buffer SB 1X pH 8,5. La cuantificación se realizó por comparación con un estándar de concentración conocida y en función de la misma se realizaron las diluciones necesarias hasta una concentración de trabajo promedio de 30 ng/μL.

La amplificación de las SSRs fue realizada en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems, con un volumen final de 15 μL conteniendo 30 ng de ADN, Buffer 1X con 1,5 mM MgCl₂, 2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada cebador y 0,2 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega). El ciclado de la PCR consistió en: 2 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificación de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de apareamiento de los cebadores a 47°C y 45 segundos de polimerización a 68°C. Los marcadores SCAR-tgmr y STS-A2D8 fueron amplificados siguiendo el protocolo propuesto por Guillin *et al.*, (2004) y Meksem *et al.*, (2001) respectivamente.

Los productos de amplificación de las SSRs fueron separados mediante electroforesis en mini geles de poliacrilamida al 12 %, mientras que STS-A2D8, SCAR-tgmr y AK-HSDS_{548/563} en geles de agarosa MetaPhorTM al 3 %. La tinción se realizó en una solución al 10 % de bromuro de etidio y posteriormente fueron visualizados bajo luz UV, la digitalización de imágenes se efectuó mediante una cámara digital Kodak Digital Science DC120200M y el software Kodak Digital Science 1D V2.0.3.

Grupo de ligamiento A2 (*Rhg4*)

Los marcadores AK-HSDS_{548/563} y STS-A2D8 estrechamente ligados al gen *Rhg4* y los microsatélites Satt315, Satt400, Sat_162, Satt632, Sat_212 y Satt424 asociados a esta región genómica, fueron utilizados para la caracterización del PD Hartwig y el PR NEM 3107. La distancia que cubren estos marcadores corresponde a 15,3 cM del mapa genético de referencia (Tabla 3.3).

Grupo de ligamiento N (*Rps1-k*)

El marcador SCAR-tgmr utilizado para la selección del gen *Rps1-k* fue desarrollado en nuestro laboratorio y posee alta eficacia para el uso en selección asistida. Además, fueron seleccionados del mapa genético de referencia, los microsatélites Satt159, Satt009 y Satt641 con el fin de caracterizar el PD Williams 82 y el PR NEM 3107. La distancia de ligamiento entre estos marcadores es de 2,20 cM según el mapa de referencia (Tabla 3.3).

Grupo de ligamiento G (*Rpp4*)

Los microsatélites Satt505, Satt288, Satt612, Sct199, Satt191 y Satt472 fueron seleccionados del mapa genético de soja por estar asociados a la región donde se localiza el gen *Rpp4* que confiere resistencia a la roya asiática de la soja. Estos marcadores se utilizaron para caracterizar el PD L87-0482 y el PR NEM 3107. La distancia de ligamiento entre estos marcadores es de 33.6 cM en el mapa de referencia (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Tamaño en pares de bases (pb) de los marcadores moleculares en los genotipos patrones y su posición en el mapa genético de referencia.

Marcador	GL	pb	P	Referencia
Satt315	A2	236	41.6	Song <i>et al.</i> (2004)
Sat_400	A2	-	46.7	Song <i>et al.</i> (2004)
Sat_162	A2	175	47.1	Song <i>et al.</i> (2004))
Satt632	A2	266	47.5	Song <i>et al.</i> (2004))
AK-HSDH _{548/563}	A2	-	-	Matthews <i>et al.</i> (1998)
STS-A2D8	A2	405	-	Meksem <i>et al.</i> (2001)
Sat_212	A2	303	50.8	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt424	A2	270	56.2	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt159	N	286	21.8	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt009	N	163	22.4	Song <i>et al.</i> (2004)
SCAR-tgmr	N	400	-	Guillin <i>et al.</i> (2004)
Satt641	N	318	23.3	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt505	G	190	63.7	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt288	G	228	74.4	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt612	G	241	76.6	Song <i>et al.</i> (2004)
Sct199	G	205	88.2	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt472	G	225	88.4	Song <i>et al.</i> (2004)
Satt191	G	227	91.9	Song <i>et al.</i> (2004)

GL: grupo de ligamiento; P: posición en el mapa genético de referencia

Por último, los datos obtenidos fueron graficados con el auxilio del programa para computadoras GGT 2.0 edición 2007 (Van Berloo, 2008).

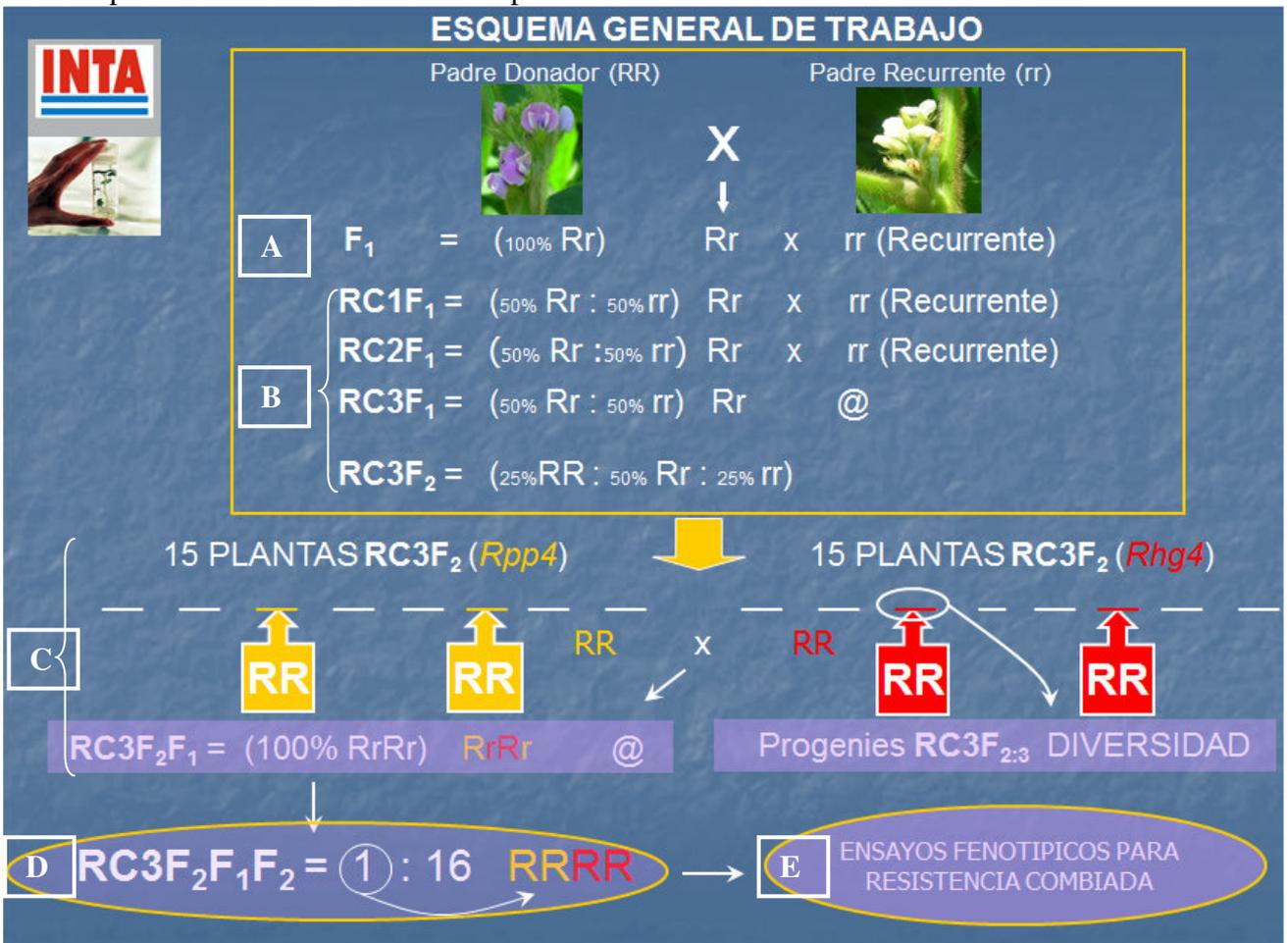
Estrategia de selección

En la Figura 3.1 se presenta el esquema de selección utilizado, considerando como ejemplo los genes *Rpp4* y *Rhg4*. En la etapa A se obtuvieron las plantas F₁ (heterocigotas) a partir de cruzamientos entre el PD y el PR. En la etapa B se realizaron tres generaciones de RC para cada uno de los genes; en cada generación se seleccionaron plantas heterocigotas

para cada gen, finalmente las plantas RC₃ obtenidas se dejaron auto-polinizar. En la etapa C se seleccionaron plantas homocigotas para cada gen, las cuales fueron cruzadas y sus progenies caracterizadas en la etapa D para la selección de plantas doble homocigota (capítulo 5). En la etapa E las progenies obtenidas de plantas doble homocigotas fueron expuestas a los patógenos en experimentos controlados, a fin de confirmar la incorporación de los genes de resistencia (capítulo 5).

Además en la etapa C fueron evaluadas progenies derivadas de plantas RC_{3F₂} en un experimento a campo a fin de determinar la diversidad y el nivel de adaptación de las mismas en esta etapa del proceso, para lo cual se evaluaron los principales caracteres para adaptación en soja (capítulo 4).

Figura 3.1. Esquema de mejoramiento genético para la piramidación de genes con selección asistida por marcadores moleculares en poblaciones derivadas de retro-cruzamientos.



RR: genotipo resistente homocigota; rr: genotipo susceptible homocigota; Rr: genotipos heterocigota; @: auto- polinización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de parentales

En la Tabla 3.4 se muestra el tamaño en pb de cada MM para cada uno de los parentales por comparación con el marcador estándar de peso molecular Ladder 50 pb plus de PB-L productos Bio-Lógicos. Para todas las regiones genómicas analizadas, todos los MM amplificaron fragmentos de tamaño acorde a lo esperado en comparación con los genotipos patrones (Tabla 3.3), lo cual indica que las amplificaciones logradas corresponden a los MM usados y que la selección de estos implica la selección de los *locus* de interés. En la Figura 3.2 se muestra el polimorfismo detectado en geles de electroforesis entre los genotipos parentales para los MM más ligados a los genes de interés.

Para la región del gen *Rhg4* se determinó el polimorfismo en los parentales Hartwig y NEM 3107 para ocho MM; en todos los casos los fragmentos amplificados mostraron diferencias de cinco o más pb, excepto para Satt315 y Sat_400 los cuales presentaron para ambos parentales el mismo tamaño del fragmento amplificado con 250pb y 255pb respectivamente.

Para la región del gen *Rsp1-k* se probaron tres MM del tipo SSRs y un marcador tipo SCAR (dominante) en los parentales Williams 82 y NEM 3107, en todos los casos se observaron diferencias de más de cinco pb entre los fragmentos amplificados en ambos parentales, excepto para SCAR-tgmr que por ser un marcador dominante expresó polimorfismo por ausencia del fragmento correspondiente a NEM 3107.

Para caracterizar la región del gen *Rpp4*, se probaron seis MM del tipo SSRs entre los parentales L87-0482 y NEM 3107, en todos los casos se obtuvieron fragmentos con diferencias de tamaño de cinco o más pb, excepto para Satt612 y Satt472 que amplificaron fragmentos de igual tamaño en ambos parentales con 250 y 230 pb respectivamente.

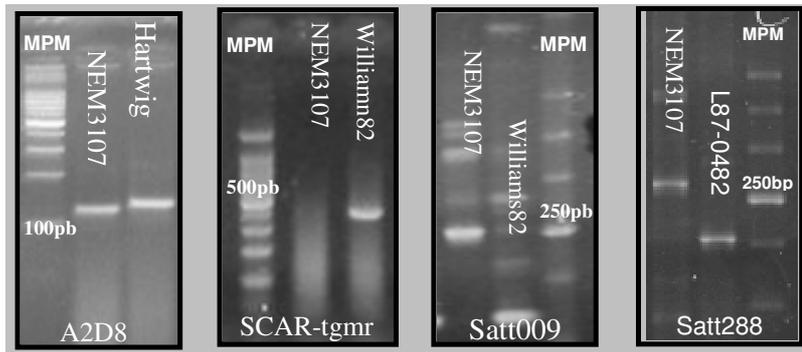
En este trabajo se consideraron polimórficos los MM que presentaron diferencias entre los parentales de cinco o más pb debido a que el sistema utilizado para la detección de polimorfismo (mini geles de poliacrilamida y agarosa MetaPhorTM) no posee resolución inferior a cinco pb. Esta estrategia podría ser un inconveniente para el uso de selección asistida en progenies derivadas de genotipos muy semejantes ya que el método no detecta pequeños polimorfismos que pueden ser útiles para la selección de regiones genómicas de interés. Sin embargo, este sistema es muy efectivo por su practicidad y bajo costo lo cual lo hace muy útil para el uso en SAM.

En este sentido los trabajos de caracterización molecular de germoplasma para regiones genómicas portadoras de genes de interés, es una estrategia que permite desarrollar poblaciones polimórficas que puedan ser seleccionadas con el sistema de detección disponible en cada programa de mejoramiento genético.

En este trabajo los parentales resultaron altamente polimórficos para las regiones genómicas de interés; si bien estos son cultivares, con lo cual se espera baja variabilidad entre ellos el polimorfismo molecular detectado demuestra que la combinación entre cultivares desarrollados para diferentes condiciones agroecológicas (cultivares locales x cultivares exóticos) puede ser una estrategia interesante para el desarrollo de poblaciones polimórficas aptas para la selección de regiones genómicas de interés.

Además la estrategia de usar varios MM para la selección de un fragmento cromosómico que incluya al gen de interés representa una ventaja, debido a que se incrementa la probabilidad de encontrar polimorfismo, en comparación con el uso de un único MM estrechamente ligado al gen.

Figura 3.2. Fragmentos amplificados por los marcadores moleculares más ligados a los genes de interés en cada genotipo parental.



MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

Tabla 3.4. Tamaño de alelos en pares de bases (pb) para cada marcador molecular en cada genotipo parental.

Marcador	GL	NEM 3107	Hartwig	Williams 82	L87-0482
Satt315	A2	250	250		
Sat_400	A2	255	255		
Sat_162	A2	125	140		
Satt632	A2	255	250		
AK-HSDH _{548/563}	A2	960 + 996	996 + 1160		
STS-A2D8	A2	140	150		
Sat_212	A2	230	225		
Satt424	A2	200	245		
Satt159	N	275		300	
Satt009	N	250		175	
SCAR-tgmr	N	0		400	
Satt641	N	340		360	
Satt505	G	160			180
Satt288	G	250			200
Satt612	G	250			250
Sct_199	G	200			225
Satt472	G	230			230
Satt191	G	230			255

GL: grupo de ligamiento

Esquema de selección

Etapa A

En la Tabla 3.5 se presentan las plantas F_1 obtenidas para cada combinación. El PR NEM 3107 fue utilizado como parental hembra debido a la mayor producción y tamaño de flores por ser el genotipo más adaptado, desarrollando mayor altura y número de nudos para las fechas de siembra óptimas (capítulo 2). Por este motivo no fue posible aprovechar el marcador fenotípico color de flor para determinar la efectividad de los cruzamientos obtenidos, en este sentido se usaron los marcadores STS-A2D8, Satt009 y Satt288 para las distintas combinaciones, a fin de seleccionar las plantas F_1 derivadas de cruzamientos efectivos.

Si bien el uso de MM es una herramienta eficiente para la detección de plantas híbridas es recomendable que el parental utilizado como hembra exprese marcadores fenotípicos recesivos (flor banca y/o pubescencia gris) lo cual permite confirmar la eficacia del cruzamiento observando el fenotipo de plantas F_1 y evitando el uso innecesarios de MM. Este criterio es necesario para hacer más eficiente, en términos de costo económico el método de SAM.

En esta etapa se logró un mayor número de plantas F_1 que las necesarias; si bien no se determinó la eficacia del método de cruzamiento (cuántas flores cruzadas produjeron semillas híbridas), se observa alta proporción de plantas F_1 logradas a partir de semillas F_1 esto puede deberse a la recolección de las semillas híbridas, antes de la madurez fisiológica, durante el estadio reproductivo R6, lo cual favorece el vigor y poder germinativo de las misma. En estudios posteriores se deberá determinar la eficacia del método de cruzamientos para predecir la cantidad mínima de flores cruzada que se requieren para asegurar la obtención de la próxima generación.

Tabla 3.5. Semillas y plantas F₁ obtenidas.

Combinaciones	Semillas Obtenidas	Plantas F ₁ Obtenidas
NEM 3107 x Hartwig	8	7
NEM 3107 x Williams 82	12	10
NEM 3107 x L87-0482	9	9

Etapa B

En la Tabla 3.6 se muestra la cantidad de plantas obtenidas en cada ciclo de RC para cada gen, en total se obtuvieron 143 plantas mientras que para la caracterización molecular fueron elegidas las mejores plantas de cada ciclo durante el estadio reproductivo, a fin de caracterizar solamente las plantas óptimas para ser cruzadas. Un total de 49 de estas plantas fueron caracterizadas y en cada ciclo se seleccionaron las heterocigotas para todos los MM de cada región genómica de interés, las cuales fueron utilizadas como parentales para el próximo ciclo de RC o auto-polinización (Figura 3.3), (Anexo 2).

Tabla 3.6. Cantidad de plantas RC₁ 2 y 3 obtenidas para cada gen en cada generación de retro-cruzamiento.

Combinación	Gen	Plantas	Plantas	Plantas	Totales
		RC ₁	RC ₂	RC ₃	
NEM 3107 x Hartwig	<i>Rhg4</i>	19	15	10	44 (17)
NEM 3107 x Williams 82	<i>Rps1-k</i>	22	16	12	50 (15)
NEM 3107 x L87-0482	<i>Rpp4</i>	15	15	19	49 (17)
Totales		56	46	41	143 (49)

(): plantas óptimas para ser cruzadas en estado reproductivo.

En la Tabla 3.7 se muestran las 17 plantas caracterizadas para el gen *Rhg4* en las tres generaciones de RC con cinco MM (Satt632, Sat_162, AK-HSDH_{548/563}, STS-A2D8 y Sat_212) abarcando una distancia de 4,8 cM (Tabla 3.3). Esta distancia de ligamiento indica que en 17 plantas no deberían ocurrir eventos de recombinación entre los MM aun

considerando los que se localizan en los extremos de esta región genómica, esperando en las progenies un 50 % de plantas heterocigotas y 50 % de plantas homocigotas para todos los MM, es decir que este fragmento cromosómico debería heredarse como un FCNR. Este supuesto se cumplió de forma parcial y fueron identificadas solamente diez plantas sin recombinación, seis homocigotas y cuatro heterocigotas de estas últimas dos en el primer ciclo de retro-cruzamientos (RC₁) y una en cada uno de los ciclos siguientes (RC_{2 y 3}) (Figura 3.3 A). Para el resto de las plantas fueron detectados siete eventos de recombinación (Tabla 3.7), en la pl1 de RC_{1y2} se produjo recombinación entre los marcadores Satt632 y Sat_162, mientras que en la pl5 de RC₁, pl2 de RC₂ y pl1 y 2 de RC₃ se produjo recombinación entre los marcadores STS-A2D8 y Sat_212, por último en la pl5 de RC₂ se observó recombinación entre Sat_162 y AK-HSDH_{548/563} (Figura 3.3 A).

Tabla 3.7. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC_{1, 2 y 3} para la región del GL A2 asociada al gen *Rhg4*.

	Plantas	Homocigota (%)	Heterocigota (%)	Eventos de Recombinación
RC ₁	1	3.7	96.3	1
	2	0.0	100.0	0
	3	100.0	0.0	0
	4	100.0	0.0	0
	5	25.1	74.9	1
	6	0.0	100.0	0
	7	100.0	0.0	0
RC ₂	1	3.7	96.3	1
	2	25.1	74.9	1
	3	100.0	0.0	0
	4	100.0	0.0	0
	5	81.7	18.3	1
	6	0.0	100.0	0
	7	100.0	0.0	0
RC ₃	1	25.1	74.9	1
	2	25.1	74.9	1
	3	0.0	100.0	0

En la Tabla 3.8 se muestra que para el GL N fueron caracterizadas 15 plantas para las tres generaciones de RC con cuatro MM (Satt159, Satt009, SCAR-tgmr y Satt641) abarcando una distancia de 2,2 cM (Tabla 3.3). Como en el caso anterior se espera que toda la región cromosómica analizada se herede como un FCNR. Sin embargo, solamente en diez plantas no se produjeron recombinaciones de las cuales cuatro fueron homocigotas y seis heterocigotas, de estas últimas tres plantas se identificaron en el primer ciclo de retro-cruzamientos (RC₁), una en el segundo (RC₂) y dos en el tercer ciclo (RC₃) (Figura 3.3 B). En el resto de las plantas fueron detectados cinco eventos de recombinación (Tabla 3.8), en la pl3 de RC₁ se produjo recombinación entre Satt641 y SCAR-tgmr mientras que se observaron recombinaciones entre Satt632 y Sat_162 en la pl4 y pl6 de RC₁, pl4 de RC₂ y en la pl3 de RC₃ (Figura 3.3 B).

Tabla 3.8. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC_{1,2 y 3} para la región del GL N asociada al gen *Rps1-k*.

	Plantas	Homocigota (%)	Heterocigota (%)	Eventos de Recombinación
RC ₁	1	0.0	100.0	0
	2	0.0	100.0	0
	3	82.3	17.7	1
	4	20.2	79.8	1
	5	0.0	100.0	0
	6	79.8	20.2	1
RC ₂	1	100.0	0.0	0
	2	100.0	0.0	0
	3	0.0	100.0	0
	4	20.2	79.8	1
	5	100.0	0.0	0
RC ₃	1	0.0	100.0	0
	2	100.0	0.0	0
	3	20.2	79.8	1
	4	0.0	100.0	0

En la Tabla 3.9 se muestra que para el GL G fueron caracterizadas 17 plantas con tres marcadores moleculares (Satt505, Satt288 y Satt191) abarcando un total de 36,6 cM (Tabla 3.3). En este caso se esperan seis plantas recombinantes sin embargo, fueron observadas ocho plantas con nueve eventos de recombinación, en la pl2 de RC₁ y en las pl1 y pl2 de RC₃ se produjo recombinación entre Satt288 y Satt191, mientras que en las pl4 y pl6 de RC₁, pl1 y pl2 de RC₂ y pl1 y pl4 de RC₃ se produjo recombinación entre Satt288 y Satt505. Por otro lado en nueve plantas no se produjeron recombinaciones, de las cuales cinco fueron homocigotas y tres heterocigotas, de estas últimas, una planta fue identificada en el primer ciclo de retro-cruzamiento (RC₁), dos en el segundo (RC₂) y una en el tercero (RC₃), (Figura 3.3 C).

Tabla 3.9. Porcentaje de genoma homocigota, heterocigota y eventos de recombinación en plantas RC₁, 2 y 3 para la región del GL G asociada al gen *Rpp4*.

	Plantas	Homocigota (%)	Heterocigota (%)	Eventos de Recombinación
RC ₁	1	100.0	0.0	0
	2	29.5	70.5	1
	3	100.0	0.0	0
	4	79.5	20.5	1
	5	0.0	100.0	0
	6	20.5	79.5	1
RC ₂	1	20.5	79.5	1
	2	79.5	20.5	1
	3	0.0	100.0	0
	4	100.0	0.0	0
	5	100.0	0.0	0
	6	100.0	0.0	0
	7	0.0	100.0	0
RC ₃	1	50.0	50.0	2
	2	29.5	70.5	1
	3	0.0	100.0	0
	4	79.5	20.5	1

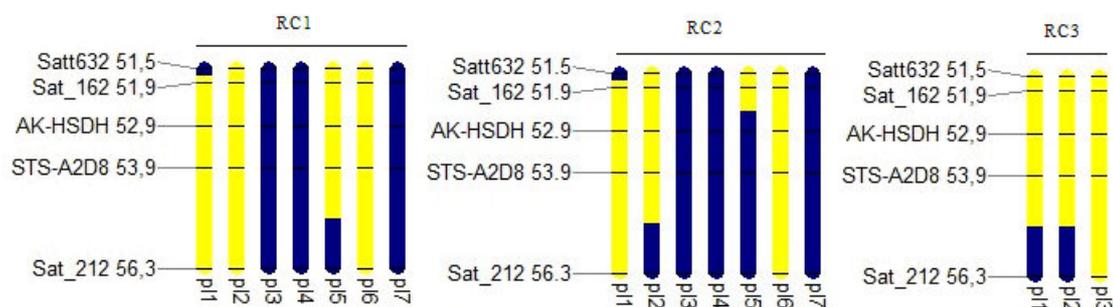
No se observaron dobles recombinantes en las tres regiones cromosómicas estudiadas excepto en el GL G (p11 de RC₃). En este caso para los intervalos de distancia entre los marcadores Satt288 y Satt505 de 13,8cM y Satt288 y Satt191 de 19,8 cM (Tabla 3.3) se calculó la frecuencia de dobles recombinantes como el producto entre las frecuencia de recombinación de cada intervalo lo que determinó una proporción de doble recombinante de 1:37 plantas para los 33,6 cM de esta región del mapa, es decir que se necesitan más del doble de las plantas analizadas (17 plantas) para encontrar una planta doble recombinante.

Estos datos muestran que las regiones genómicas estudiadas de los GL A2 y GL N no se heredan como FCNR como es de esperar según las distancias de ligamiento del mapa genético de referencia, mientras que para el GL G se observó mayor frecuencia de recombinación que la esperada, además de una planta doble recombinante. Esto indica que las distancias de ligamiento de los mapas de referencia deben ser consideradas solamente como orientativas ya que la cantidad de recombinaciones entre MM y entre MM y genes puede ser superior a lo esperado.

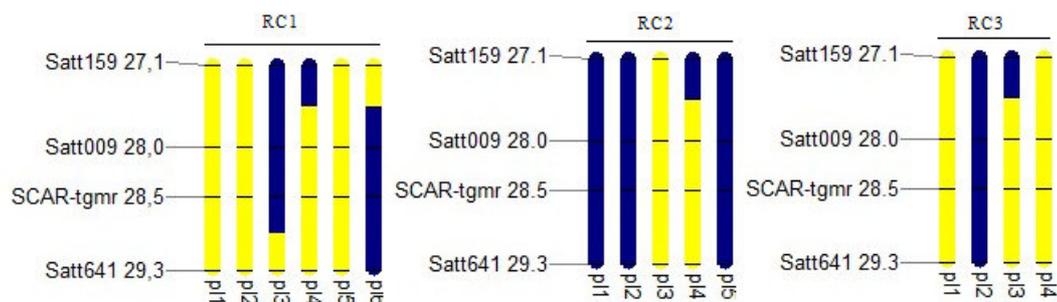
Esto es importante cuando se diseñan estrategias de selección asistida con el uso de MM que no poseen el poder de diagnosticar la presencia de genes, como es el caso de los MM neutros (SSRs) que están ligados a los genes de interés pero que no forman parte de ellos. En estos casos las recombinaciones entre MM y genes pueden llevar a la selección de plantas que poseen el MM pero no el gen de interés. Debido a este hecho y a la posibilidad de que los genes de interés puedan estar realmente localizados en una posición cercana pero diferente a la indicada en los mapas genético, es necesario caracterizar varios *loci* de cada región genómica a fin de seleccionar en cada ciclo de RC plantas heterocigotas para toda la región genómica y evitar la pérdida de genes por recombinación. Si bien esta estrategia incrementa el costo del método debido la cantidad de datos moleculares para seleccionar un único gen, esto es necesario al menos hasta que se realicen validaciones propias de distancias de ligamiento entre MM y entre MM y los genes de interés.

Figura 3.3. Plantas caracterizadas con marcadores moleculares en cada ciclo de retro-cruzamiento para las tres regiones genómicas en estudio.

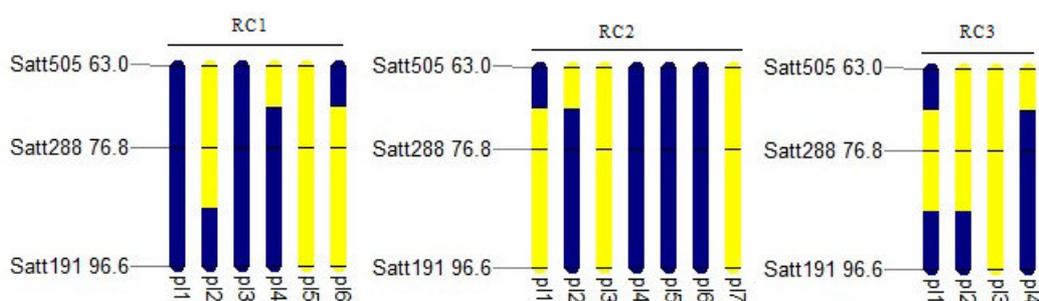
A) GL A2 - NEM 3107 x Hartwig



B) GL N - NEM 3107 x Williams 82



C) GL G - NEM 3107 x L87-0482



pl: plantas; en azul se indican las regiones cromosómicas en estado homocigota; en amarillo se indican las regiones cromosómicas en estado heterocigota; RC: retro-cruzamiento.

Etapa C

En esta etapa se auto-polinizaron plantas RC₃ heterocigotas para cada una de las tres regiones genómicas de interés. En total se obtuvieron 480 semillas RC_{3F2} de las cuales se sembraron 30 semillas para cada uno de los genes de interés (*Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4*) de las

cuales se seleccionaron 15 plantas adultas en estado óptimo para ser cruzadas. Antes del período reproductivo las plantas fueron caracterizadas con MM a fin de seleccionar plantas portadoras de los genes de interés en estado homocigota. En el Anexo 2 se presenta la composición alélica (pb) para cada una de estas plantas mientras que, en el Anexo 3 se muestran los marcadores moleculares en geles de electroforesis.

Para el GL A2 (Figura 3.4 A) se identificaron ocho plantas en las cuales no se produjeron recombinaciones y siete plantas con ocho eventos de recombinación, seis entre los marcadores Satt424 y STS-A2D8 y dos entre los marcadores Satt632 y AK-HSDS_{548/563}. Como sucedió en la etapa B no se observaron recombinantes entre AK-HSDS_{548/563} y STS-A2D8 (Figura 3.3 A) lo cual demuestra que esta región genómica se hereda como un FCNR. Si bien hay antecedentes que indican que estos dos MM están fuertemente ligados al gen *Rhg4* (Gebhardt *et al.*, 1999; Meksem *et al.*, 2001; Meksem *et al.*, 1998) lo cual será analizado en el capítulo 5, cabe aclarar que el marcador STS-A2D8 resultó más estable que AK-HSDH_{548/563}, lo cual lo hace más adecuado para la selección del gene *Rhg4*.

En el GL N (Figura 3.4 B) once plantas fueron no-recombinantes y en cuatro plantas se produjeron recombinaciones, en tres de estas se recombinaron los marcadores Satt641 y SCAR-tgmr y en una se recombinaron Satt159 y Satt009 mientras que, no se observaron recombinantes entre SCAR-tgmr y Satt009, lo cual demuestra que esta región también se hereda como un FCNR. Como en el caso anterior ambos marcadores están fuertemente ligados al gen *RpsI-k* (Bhattacharyya *et al.*, 1997; Guillin *et al.*, 2004) y ambos podrían ser utilizados para la selección del gen, sin embargo el marcador SCAR-tgmr es más eficiente que Satt009, lo que lo hace más práctico para la selección del gen.

En el GL G (Figura 3.4 C) diez plantas fueron no-recombinantes y cinco recombinantes, cuatro eventos de recombinación se produjeron entre Satt191 y Satt288 y uno entre Satt505 y Satt288, lo cual indica que en esta región no se identificó la presencia de un FCNR. Si bien en este trabajo se probaron además, los MM Satt612, Sct_199 y Satt472 (Tabla 3.4) localizados en una posición intermedia entre Satt288 y Satt191, dos de estos (Satt612 y Satt472) no fueron polimórficos entre los parentales, mientras que Sct_199 fue

muy inestable en las amplificaciones con la PCR lo cual lo hace poco práctico para su uso en SAM.

Considerando los datos de mapas de ligamiento obtenidos en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigadores (Yamanaka *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2008; Gilli *et al.*, 2009) Satt288 estaría a una distancia de, entre 1,3 cM y 9.5 cM al gen *Rpp4* (Figura 1.3). Si se considera la mayor distancia mencionada (9.5 cM) deberían ocurrir 1.4 eventos de recombinación entre Satt288 y *Rpp4* para las 15 plantas analizadas, lo cual produciría una planta con el MM Satt288 del PD pero sin el gene de resistencia.

Una simulación con 50 QTL (*Quantitative trait loci*) en una población de 200 plantas realizada por Bertrand *et al.* (2004) determinó que la frecuencia de alelos favorables subió a 100 % en 10 generaciones cuando los marcadores se localizaban exactamente en el QTL, pero sólo hasta 92 % cuando los marcadores se localizaban a 5 cM del QTL, demostrando que se pueden perder genes durante el proceso de selección en poblaciones grandes a causa de la recombinación entre estos y los MM ligados.

En adición algunos estudios indican que el método de SAM se hace más eficiente cuando la selección se realiza a través de FCNR, es decir usando varios MM en la región de interés (Lange y Whittaker, 2001; Meuwissen *et al.*, 2001) lo que representa la estrategia opuesta al uso de un único MM identificado por mapeo fino (Bertrand *et al.*, 2004) sin embargo, esta estrategia puede resultar muy costosa debido a la cantidad de datos necesarios para la selección de un único gen.

En este sentido y para evitar la pérdida del gen *Rpp4* por recombinación en futuros trabajos de SAM, se deberán identificar o desarrollar nuevos MM localizados en esta región del genoma a fin de detectar todos los eventos de recombinación en esta región e identificar un FCNR que contenga al gen *Rpp4*.

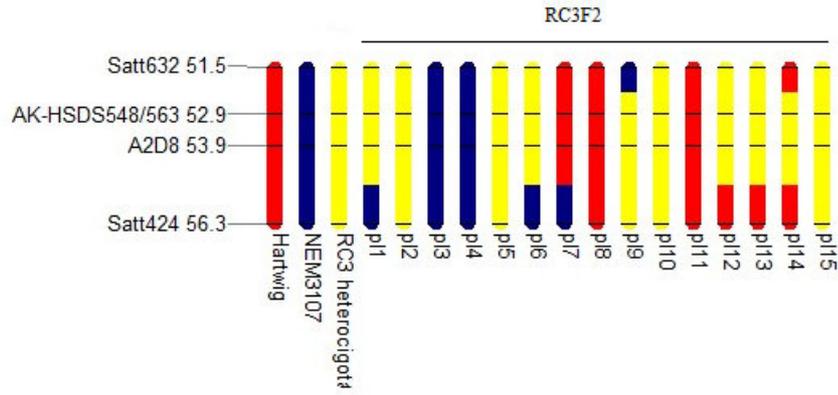
En este trabajo se demostró que para las regiones genómicas estudiadas de los GL A2 y N es posible seleccionar FCNR cuando el tamaño de la población es pequeño. En este caso

se caracterizaron un total de entre 30 y 32 plantas para cada región genómica de interés en los tres generaciones de RC (Figura 3.3) y RC_{3F2} (Figura 3.4) lo cual indica que para este tamaño poblacional no se esperan recombinantes entre SCAR-tgmr y Satt009 (GL N) y entre AK-HSDS_{548/563} y STS-A2D8 (GL A2) ya que ambas regiones segregan como FCNR.

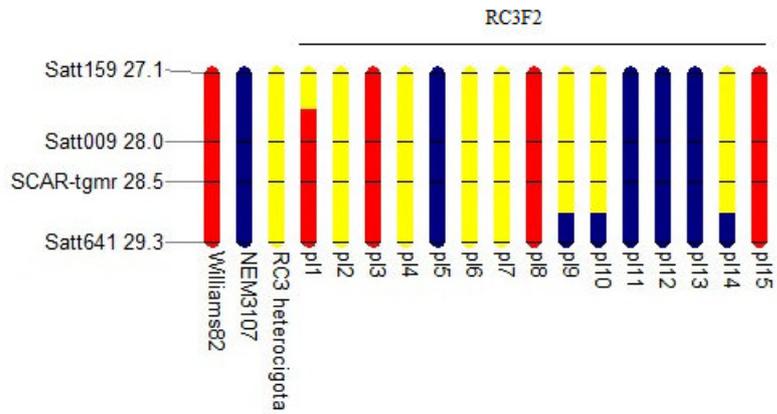
Como ya fue mencionado es necesario validar las distancias de ligamiento entre MM de los mapas de referencia sin embargo, una vez ajustadas las distancias se puede predecir el tamaño poblacional adecuado para seleccionar FCNR usando un único MM. Debido al requerimiento de poblaciones pequeñas esta estrategia es adecuada para la combinación de hasta dos genes en poblaciones de RC y di-híbridas, la piramidación de más genes será discutida en el capítulo 5.

Figura 3.4. Genotipo de las plantas RC_{3F2} caracterizadas.

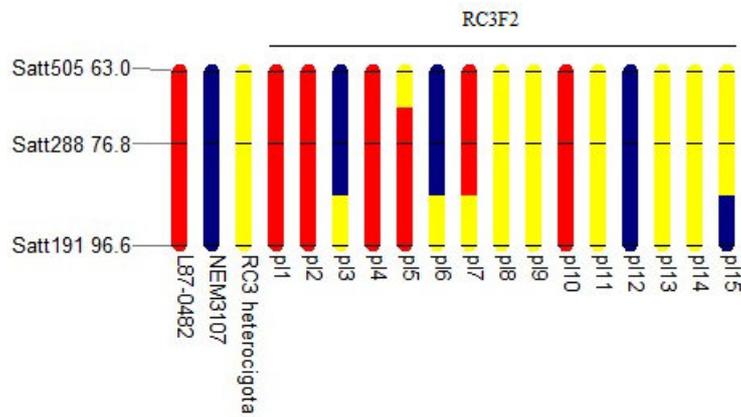
A



B



C



A: GL A2 (NEM 3107 X Hartwig); B: GL N (NEM 3107 X Williams 82); C: GL G (NEM 3107 X L87-0482); en azul se indican las regiones cromosómicas del parental recurrente (NEM 3107); en rojo se indican las regiones cromosómicas del parental donador; en amarillo se indican las regiones cromosómicas en estado heterocigota; p11 ~ p15: plantas RC_{3F2}.

Selección de plantas homocigotas para los genes *Rhg4*, *RpsI-k* y *Rpp4*

En la Tabla 3.10 se muestra la composición alélica de las plantas RC_{3F2} seleccionadas para cada una de las regiones genómicas de interés. Para el gen *Rhg4* se seleccionaron tres plantas (pl7, pl8 y pl11) homocigotas para los alelos del PD en todos los MM de esta región genómica, excepto la pl7 que presentó al alelo del PR para Satt424. Para el gen *RpsI-k* (GL N) cuatro plantas (pl1, pl3, pl8 y pl15) fueron seleccionadas por ser homocigotas para los alelos del PD en todo los MM de esta región genómica, excepto la pl1 heterocigota para Satt159; mientras que para *Rpp4* (GL G) fueron seleccionadas seis plantas (pl1, pl2, pl4, pl5, pl7 y pl10) homocigotas para los alelos del PD en todo los MM de esta región genómica, excepto las pl5 y pl7 heterocigotas para Satt505 y Satt191, respectivamente (Figura 3.4).

Tabla 3.10. Composición alélica de las plantas RC_{3F2} seleccionadas para cada región genómica de interés.

Gen	MM	P (cM)	Plantas RC _{3F2}									
			pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl7	pl8	pl10	pl11	pl15
<i>Rhg4</i>	Satt632	51.50						A	A		A	
	AK-HSDH _{548/563}	52.90						A	A		A	
	STS-A2D8	53.90						A	A		A	
	Satt424	56.32						B	A		A	
<i>RpsI-k</i>	Satt159	27.13	H		A					A		A
	Satt009	28.00	A		A					A		A
	SCAR-tgmr	28.52	A		A					A		A
	Satt641	29.28	A		A					A		A
<i>Rpp4</i>	Satt505	63.00	A	A		A	H	A			A	
	Satt288	76.77	A	A		A	A	A			A	
	Satt191	96.57	A	A		A	A	H			A	

MM: marcador molecular; P (cM): posición en el mapa genético medido en centimorgan; A: estado homocigota para el parental donante; B: estado homocigota para el parental recurrente; H: estado Heterocigota.

Combinación de genes *Rhg4* y *Rpp4*

En la Tabla 3.11 se muestran las 17 combinaciones (Comb. 1~17) obtenidas entre las tres plantas seleccionadas para el gen *Rhg4* y la seis para el gen *Rpp4*. Por cruzamiento entre ambos grupos de plantas se obtuvieron 58 semillas F₁ de las cuales se lograron 42 plantas que

fueron caracterizadas con los marcador STS-A2D8 (GL A2) y Satt288 (GL G) confirmando que todas fueron heterocigotas para ambos marcadores y derivan de cruzamientos efectivos, excepto una plantas de la comb.3, dos de la comb.10 y dos de la comb.17, que fueron descartadas por ser derivadas de auto-polinizaciones.

Tabla 3.11. Combinaciones entre plantas RC_{3F2} homocigotas para los genes *Rhg4* (GL A2) y *Rpp4* (GL G).

N°	Planta ♀	Planta ♂	N° Semillas	
			F ₁	N° Plantas F ₁
1	GL A2(pl7)	GL G (pl2)	4	2
2	GL G (pl2)	GL A2 (pl8)	7	5
3	GL A2(pl11)	GL G (pl7)	2	2
4	GL A2 (pl8)	GL G (pl10)	1	1
5	GL G (pl5)	GL A2 (pl11)	3	3
6	GL G (pl4)	GL A2 (pl7)	6	4
7	GL G (pl1)	GL A2(pl11)	1	1
8	GL A2 (pl8)	GL G (pl4)	4	3
9	GL A2 (pl7)	GL G (pl10)	2	2
10	GL G (pl7)	GL A2 (pl8)	1	1
11	GL G (pl1)	GL A2 (pl7)	6	3
12	GL A2(pl11)	GL G (pl2)	2	2
13	GL A2(pl11)	GL G (pl4)	4	2
14	GL A2 (pl7)	GL G (pl5)	2	2
15	GL G (pl5)	GL A2 (pl8)	5	3
16	GL G (pl7)	GL A2 (pl7)	1	1
17	GL A2(pl11)	GL G (pl10)	7	5

Combinación de genes *Rhg4* y *Rps1-k*

En las Tablas 3.12 se muestran las seis combinaciones (Comb. 1~6) entre las tres plantas seleccionadas para el gen *Rhg4* y las cuatro para *Rps1-k*. Por cruzamiento entre ambos grupos de plantas se lograron 14 semillas F₁ de las cuales se obtuvieron 13 plantas que fueron caracterizadas con los marcadores STS-A2D8 (GL A2) y SCAR-tgmr (GL N) confirmando

que todas las plantas fueron derivadas de cruzamientos efectivos siendo heterocigotas para ambos marcadores.

Tabla 3.12. Combinaciones entre plantas RC_{3F2} homocigotas para los genes *Rhg4* (GL A2) y *Rps1-k* (GL N).

N°	Planta ♀	Planta ♂	N° Semillas	
			F ₁	F ₁
1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	3	2
2	GL A2 (p17)	GL N (p18)	1	1
3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	2	2
4	GL A2 (p18)	GL N (p18)	4	4
5	GL A2 (p111)	GL N (p18)	1	1
6	GL N (p13)	GL A2 (p111)	3	3

Combinación de genes *Rpp4* y *Rps1-k*

En la Tabla 3.13 se muestran las ocho combinaciones (Comb. 1~8) entre las cuatro plantas seleccionadas para el gen *Rps1-k* y las seis para *Rpp4*. Por cruzamiento entre ambos grupos de plantas se lograron 21 semillas F₁ de las cuales se obtuvieron 13 plantas que fueron caracterizadas con los marcadores SCAR-tgmr (GL N) y Satt288 (GL G) determinando que todas las plantas fueron heterocigotas para ambos marcadores, excepto una planta de la comb.5, descartada por derivar de auto-polinización.

Tabla 3.13. Combinaciones entre plantas RC_{3F2} homocigotas para los genes *Rps1-k* (GL N) y *Rpp4* (GL G).

N°	Planta ♀	Planta ♂	N° Semillas	
			F ₁	F ₁
1	GL G (p11)	GL N (p13)	2	2
2	GL G (p14)	GL N (p13)	1	1
3	GL N (p13)	GL G (p110)	1	1
4	GL G (p14)	GL N (p18)	1	1
5	GL N (p18)	GL G (p17)	3	2
6	GL N (p18)	GL G (p11)	5	2
7	GL N (p18)	GL G (p12)	4	2
8	GL N (p18)	GL G (p15)	4	2

En esta parte del proceso de mejoramiento los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* fueron combinados de a pares en plantas di-híbridas luego de tres generaciones de retro-cruzamientos.

Se caracterizaron un total de 94 plantas entre las poblaciones derivadas de RC_{1, 2 y 3} y RC_{3F2} generando un total de 361 datos moleculares (Tabla 3.14). Considerando que se lograron combinar los genes en plantas di-híbridas usando poblaciones de tamaño reducido y que es posible detectar FCNR que se heredan como factores mendelianos que pueden ser seleccionados usando un único MM en poblaciones pequeñas, se demostró que el método utilizado fue eficiente.

Sin embargo, en el próximo capítulo se discutirá si las plantas di-híbridas obtenidas como producto de la combinación de estos genes poseen variabilidad genética adecuada para la obtención de líneas que puedan ser probadas directamente en ECR a fin de seleccionar nuevas combinaciones exóticas de genes favorables para caracteres de importancia agronómica como el rendimiento de granos.

Tabla 3.14. Cantidad de plantas obtenidas y marcadores moleculares usados para la selección de los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* en las poblaciones de RC_{1, 2 y 3} y RC_{3F2}.

Gen	RC _{1, 2 y 3}			RC _{3F2}			Total
	P	MM	ST	P	MM	ST	
<i>Rhg4</i>	17	5	85	15	4	60	145
<i>Rps1-k</i>	15	4	60	15	4	60	120
<i>Rpp4</i>	17	3	51	15	3	45	96
Total	49	12	196	45	11	165	361

P: cantidad de plantas logradas; MM: cantidad de marcadores moleculares usados; ST: subtotal de datos moleculares obtenidos.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 13 plantas RC_{3F2} homocigotas para las tres regiones genómicas de interés; a partir de estas se lograron 31 combinaciones entre los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4*.

Las mayores distancias de ligamiento detectadas entre los MM utilizados, respecto a las distancias de los mapas de referencia, demuestra que es necesario validar en experimentos propios las distancias entre MM y entre MM y genes.

Entre los marcadores AK-HSDS_{548/563} y STS-A2D8 asociados al gen *Rhg4* y entre SCAR-tgmr y Satt009 asociado a *Rps1-k*, no se produjeron recombinaciones lo que permitió identificar dos FCNR que pueden ser seleccionados como factores mendelianos en poblaciones pequeñas de hasta 32 plantas.

Se recomienda el uso de los MM STS-A2D8 y SCAR-tgmr para la selección de los FCNR de los GL A2 y GL N respectivamente.

EVALUACION FENOTIPICA PARA LA RECUPERACIÓN DE LOS PRINCIPALES CARACTERES DE ADAPTACIÓN DEL PARENTAL RECURRENTE

INTRODUCCIÓN

Se conoce que la base genética de la soja comercial es estrecha y menos del 1 % del germoplasma exótico de la colección de EEUU ha sido utilizada para la obtención de cultivares debido principalmente a los atributos que afectan negativamente al rendimiento (Guzman *et al.*, 2007). En Argentina la situación es semejante por lo que no hay antecedentes de uso rutinario de germoplasma exótico para el desarrollo de germoplasma comercial.

Como ya fue mencionado en el capítulo anterior el método de mejoramiento por retro-cruzamientos es el más utilizado para la incorporación de genes de interés localizados en germoplasma exótico (ej. resistencia a enfermedades) sin embargo, la cantidad de generaciones necesarias para recuperar más del 99 % del parental recurrente es una limitante que desalienta el uso de este método.

Frisch *et al.* (1999a) simularon un esquema de retro-cruzamientos que considera el uso de MM para la recuperación rápida del fondo recurrente durante la fijación de un único gen de interés, este método podría ser aplicado para la incorporación de genes exóticos al germoplasma comercial sin embargo, la idea de obtener como resultado un genotipo idéntico al parental recurrente no representa una alternativa interesante para los programas comerciales de mejoramiento genético de soja debido a la necesidad de avanzar con la ganancia genética en cada ciclo de mejoramiento a fin de mantener la competitividad comercial.

Una excepción a esta regla es el caso de los genes RR2 y BT que en la campaña agrícola 2013/14 fueron liberados al mercado Argentino por Monsanto a través de la soja Intacta Asgrow y por las empresas Nidera Argentina y Asociación Don Mario S. A. En este caso estos genes fueron transferidos al germoplasma comercial a través de retro-cruzamientos ya que el impacto comercial que producen estos nuevos eventos lo justifica.

Un antecedente que revalorizó la importancia del uso de germoplasma exótico fue realizado por Stuber *et al.* (1999) quienes desarrollaron un esquema de SAM para incrementar el rendimiento en líneas de maíz usando un sistema de retro-cruzamientos, el cual permitió identificar líneas con genes exóticos que incrementaban el rendimiento de granos. Este concepto fue aplicado en un trabajo de SAM en soja (Ribaut *et al.*, 1999) en el cual se puso a prueba un esquema a gran escala usando MM localizados en todo el genoma para la selección de líneas con regiones genómicas de interés y fondos genéticos divergentes, estas líneas fueron cruzadas y finalmente sometidas a ECR, detectando como resultado genotipos transgresivos para el rendimiento de granos.

El uso de marcadores moleculares para la recuperación del PR mientras se fija el gen incorporado (Paterson, 1996), ha tenido gran impacto en programas de mejoramiento en los cuales, además de contar con marcadores ligados a los genes de interés se dispone de marcadores distribuidos en todo el genoma (Young y Tanksley, 1989).

Además las simulaciones con el auxilio de programas para computadoras representan enfoques adecuados que ofrecen una contribución importante para la utilización de MM en la recuperación de PR en programas de retro-cruzamientos (Hospital *et al.*, 1992; Tanksley y Nelson, 1996; Visscher *et al.*, 1996; Hospital y Charcosset, 1997; Knapp, 1998; Frisch *et al.*, 1999a, 1999b; Frisch *et al.*, 2000; Reyes-Valdés, 2000).

Existen algunos antecedentes que demuestran que es posible aplicar el método de retro-cruzamientos con el doble propósito de incorporar genes con efectos mayores aprovechando además las nuevas combinaciones de genes que se generan por cruzamientos entre germoplasma exótico y adaptado. En soja, fueron identificadas líneas derivadas de retro-

cruzamientos que poseen entre un 6 % y 25 % de germoplasma del parental exótico y que expresaron incremento en el rendimiento (Guzman *et al.*, 2007).

Si bien la comunidad de mejoradores de plantas ha sido muy entusiasta con la aplicación de estas herramientas, la relación entre la teoría y la práctica no ha sido aún ajustada debido principalmente a los complejos modelos matemáticos y al tamaño necesario de las poblaciones (Benchimol *et al.*, 2005).

Según Ribault *et al.* (2002) la aplicación de estas tecnologías depende de las estrategias utilizadas, las cuales deben estar diseñadas pensando en el tipo de germoplasma involucrado y las capacidades en escala para la obtención de datos moleculares de cada programa de mejoramiento genético.

Considerando estos antecedentes en este capítulo se propone realizar selección a campo para recuperar del PR los principales caracteres de adaptación en la generación RC₃. Esta estrategia permite mantener una mayor proporción de variabilidad exótica que en progenies derivadas de sistemas de retro-cruzamientos tradicionales (RC₆), lo que incrementa la posibilidad de detectar genotipos con nuevas combinaciones de genes que favorezcan el rendimiento de granos, además de disminuir la cantidad de generaciones y el uso de MM para la recuperación del PR.

OBJETIVO

Evaluar en un experimento a campo los principales caracteres de adaptación en progenies derivadas de plantas RC₃F₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintisiete progenies derivadas de plantas RC₃F₂ y los genotipos parentales Hartwig, Williams 82, L87-0482 y NEM 3107 fueron sembrados en la EEA del INTA Marcos Juárez en un diseño en bloques completos al azar y tres repeticiones, cuya unidad experimental fue representada por parcelas de dos surcos y dos metros. De las 27 progenies evaluadas, 13 fueron seleccionadas por ser homocigotas al menos para una de las regiones portadoras de los genes *Rhg4*, *Rps1-k* o *Rpp4*, mientras que las 14 progenies restantes fueron seleccionadas al azar (Figura 3.4). El ensayo fue sembrado el 1° de Diciembre de 2009 y se evaluaron los siguientes caracteres:

D/R1: Cantidad de días desde la siembra a R1;

D/R5: Cantidad de días desde la siembra a R5¹;

D/R8: Cantidad de días desde la siembra a R8;

A/R1: Altura de plantas (centímetros) en R1;

A/R5: Altura de plantas (centímetros) en R5;

A/R8: Altura de plantas (centímetros) en R8;

²VCO/R8: Vuelco de plantas en R8;

³HC: Hábito de crecimiento;

Los datos fueron analizados con el auxilio del programa InfoStat (2012) y se realizó un análisis multivariado de conglomerados, usando distancia EUCLIDEA, método de ligamiento promedio y ligamiento promedio no ponderado (UPGM) para calcular la distancia entre conglomerados.

¹ R5: Comienzo de desarrollo de la semilla. Semillas de 3 mm en uno de los cuatro nudos superiores en el 50 % de las plantas de la parcela.

² VCO: Se utilizó una escala donde 1 corresponde a planta erecta y 5 a planta volcada.

³ HC: Se utilizó una escala donde 1 corresponde a HC determinado y 3 a HC indeterminado.

Por otro lado se evaluó el Aspecto Agronómico (AA) de las progenies. Esta valoración que combina caracteres para adaptación y producción de granos es una práctica utilizada durante las primeras evaluaciones a campo en los programas de mejoramiento genético y se realiza durante el período de madurez fisiológica (R8) por evaluación del aspecto general de la parcela a través de observaciones a simple vista.

Para determinar el AA, en este trabajo se aplicó una escala de notas donde: 1 = mínimo AA y 5 = máximo AA. Las parcelas con valores de AA > 2 fueron seleccionadas por presentar un nivel adecuado de adaptación para ser incluidas directamente en ECR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de conglomerados

En la Figura 4.2 se observa el conglomerado obtenido por comparación entre los caracteres evaluados (Anexo 4), la distancia EUCLIDEA para el ligamiento promedio entre los grupos de genotipos más extremos es de 5,50 lo que representa el 100 % de la variabilidad para el germoplasma evaluado en este trabajo. Esta amplitud en la variabilidad está determinada en un extremo por el cultivar Hartwig (grupo 1) que se separó del resto por expresar caracteres de adaptación propios. El resto de las progenies junto a los PDs Williams 82 y L87-0482 y al PR NEM 3107 formaron 5 grupos (grupos 2 ~ 6), los cuales se separan a una distancia de ligamiento promedio de 2,90 que corresponde al 52 % de la variabilidad total para los caracteres estudiados.

El cultivar Williams 82, el genotipo L87-0482 y dos progenies derivadas del proceso de retro-cruzamiento se asociaron para formar el grupo 2. El resto de los grupos se formaron

exclusivamente con progenies derivadas de los retro-cruzamientos, excepto el grupo 5 en el cual además de las progenies, se ubicó el PR NEM 3107. En este grupo se diferenciaron dos subgrupos, el A contiene al PR NEM 3107 y nueve progenies con una distancia EUCLIDEA máxima de 1,90 que corresponde al 36 % de la variabilidad total y una distancia EUCLIDEA mínima al PR de 0,90 que corresponde al 16 % de la variabilidad total.

En este análisis se observa que ningún genotipo es idéntico al PR y que un pequeño porcentaje de genoma exótico (6,25 %) del PD en RC₃ (Tabla 3.1) puede expresar diferencias de más del 50 % de la variabilidad total, lo cual indica que la relación entre genotipo y fenotipo no es proporcional al menos para los principales caracteres de adaptación en soja.

No hay estudios previos que determinen la relación entre la proporción genómica del PR y la expresión fenotípica de caracteres de adaptación. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el uso exclusivo de selección genómica no garantiza la recuperación de los principales caracteres de adaptación del PR en la generación RC₃.

A diferencia de los esquemas tradicionales de retro-cruzamientos en los que se persigue como resultado final la obtención de isolíneas y donde la velocidad de recuperación de PR depende de la cantidad de MM utilizados y la capacidad de genotipado de los laboratorios, en el presente trabajo se aprovechó la variabilidad generada por el germoplasma exótico, seleccionado a campo caracteres de adaptación del PR y evitando el uso de MM a gran escala.

En base a los datos obtenidos por este análisis fueron seleccionadas las combinaciones (capítulo 3) entre las plantas más semejantes al PR a fin de continuar con el proceso de piramidación de los genes. En este sentido se seleccionaron todas las combinaciones posibles para los tres genes de interés, entre plantas RC_{3F2} del grupo 5 de la Figura 4.2. Para los genes *Rhg4* y *Rpp4* se seleccionaron las combinaciones 2, 6, 8, 9, 11, 14 y 16 (Tabla 3.11), las

combinaciones 1 y 3 para los genes *Rhg4* y *Rps1-k* (Tabla 3.12) y las combinaciones 1, 2 y 3 para los genes *Rps1-k* y *Rpp4* (Tabla 3.13).

Esta estrategia permitió piramidar los genes realizando cruzamientos entre plantas con un nivel básico de adaptación y variabilidad del 36 % para estos caracteres, lo cual limita la segregación de los mismos manteniendo un umbral de adaptación adecuado y variabilidad exótica para la selección de nuevas combinaciones de genes que puedan incrementar el rendimiento de granos.

Análisis del aspecto agronómico

Los resultados obtenidos del análisis de conglomerados fueron comparados con el AA de las veintisiete progenies estudiadas. La valoración a simple vista mostro que dentro de progenies no se detectaron plantas fuera de tipo, lo cual indica que los principales caracteres para adaptación se estabilizaron en la generación RC₃. Sin embargo la variabilidad observada entre progenies, permitió diferenciar los idiotipos A, B y C (Figura 4.1) los cuales fueron coherentes con el agrupamiento del análisis de conglomerados (Figura 4.2).

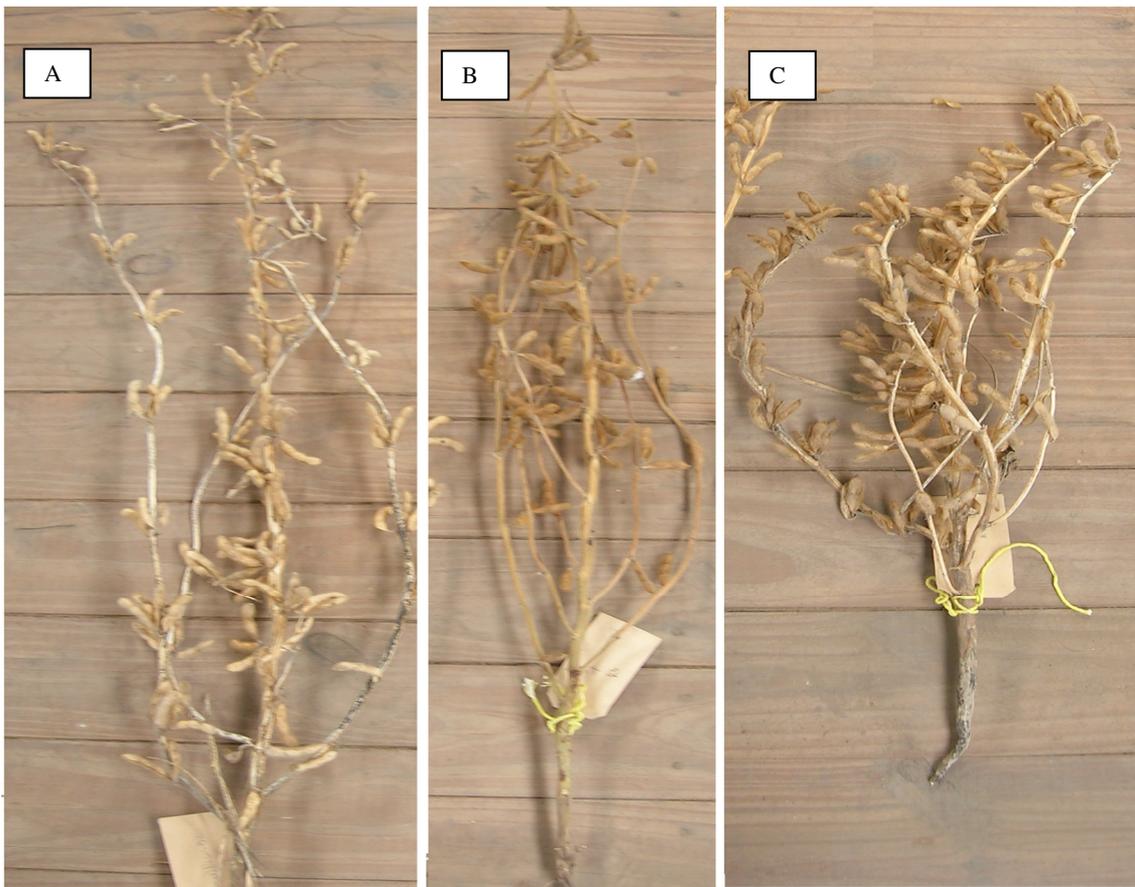
El idiotype A representado por las tres progenies que forman el grupo 6, fue el más semejante a Hartwig, presentando entrenudos largos y hábito de crecimiento indeterminado, con importante desarrollo en altura, lo que generó vuelco en todas la progenies. Si bien estas progenies se diferencian de Hartwig (AA = 1) por la expresión de caracteres favorables, la valoración visual de estas, mostró AA = 2 (Tabla 4.1) indicando que no poseen un nivel adecuado de adaptación para ser incluidas directamente en ECR.

El idiotype B, representado por las progenies que forman el grupo 5, se caracteriza por ser el más semejante al PR NEM 3107, con entrenudos y altura intermedia y hábito de crecimiento indeterminado.

El idiotipo C representado por las progenies de los grupos 3 y 4 fue el más semejante a los PDs Williams 82 y L87-0482, con entrenudos cortos y hábito de crecimiento semi-determinado, presentando la menor altura de los tres idiotipos.

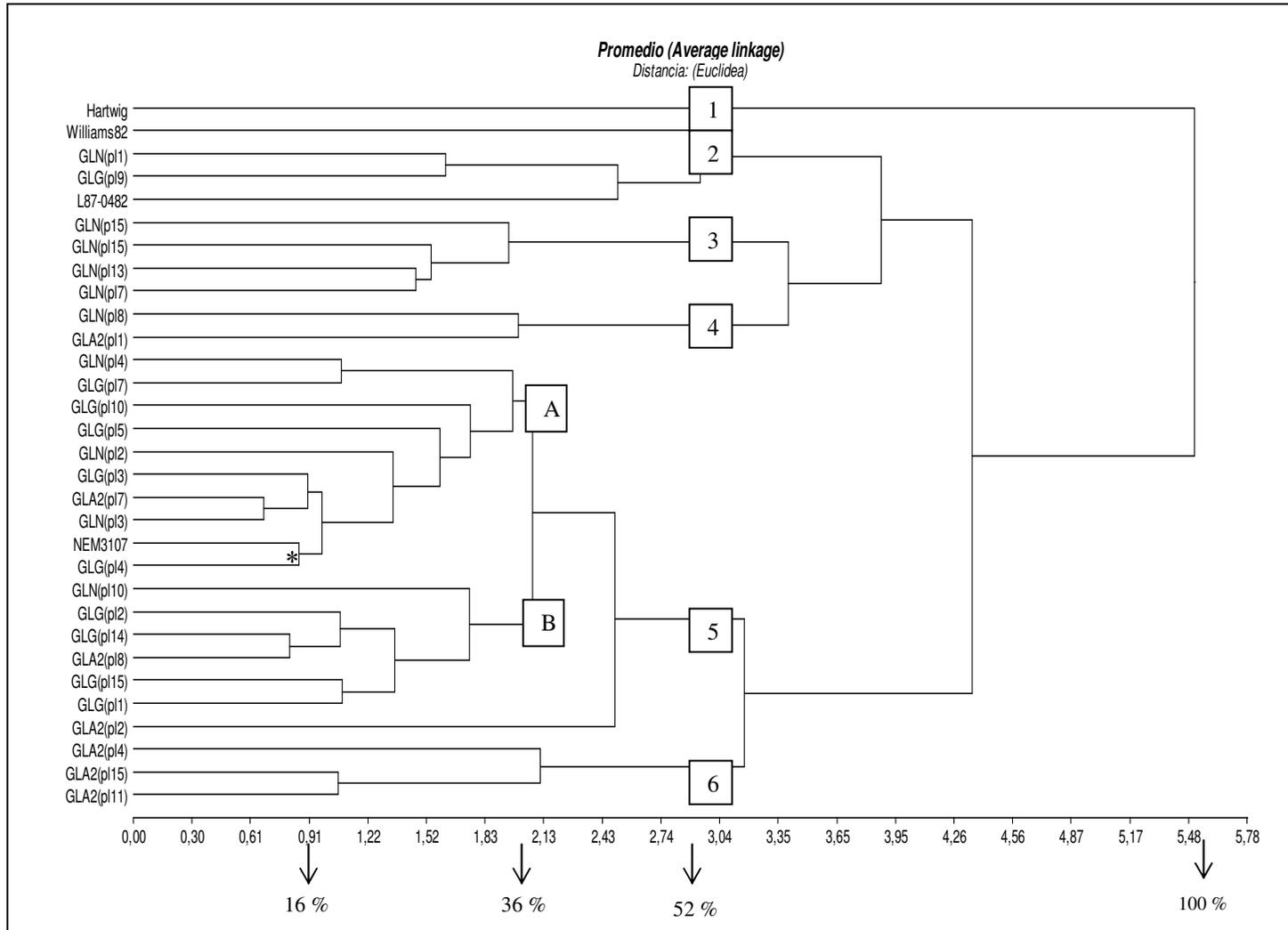
Para el caso de los idiotipos B y C se determinaron valores de AA = 3~5 (Tabla 4.1) y se consideraron con un nivel adecuado de adaptación para ser incluidas directamente en ECR. Esto indica que la valoración del AA podría evitar el descarte de plantas que no se agrupan con el PR en el análisis de conglomerados (grupo 5) pero que poseen un nivel de adaptación adecuado para ser incluidos en ECR (grupos 3 y 4).

Figura 4.1. Idiotipos identificados a través de la valoración visual del aspecto agronómico.



A: idiotipo semejante a Hartwig; B: Idiotipo semejante a NEM 3107; C: idiotipo semejante Williams 82 y L87-0482.

Figura 4.2. Conglomerado obtenido por comparación entre veintisiete progenies derivadas de plantas RC_{3F2} y los genotipos parentales para los principales caracteres de adaptación en soja.



1 ~ 6 grupos obtenidos a un 52 % de la variabilidad total; A y B subgrupos obtenidos a un 36 % de la variabilidad total; * corresponde a la menor diferencia (16 %) entre el PR y la progenie derivadas del proceso de retro-cruzamientos.

Tabla 4.1. Aspecto agronómico, idiotipo y grupo al que corresponde cada progenie y parental evaluado.

Nº	Progenie	Parentales	AA	I	GC
		Hartwig	1	PH	1
		Williams 82	3	PW	2
1	GL N (p11)		2	PW	2
2	GL G (p19)		1	PW	2
		L87-0482	2	PL	2
3	GL N (p15)		4	C	3
4	GL N (p115)		4	C	3
5	GL N (p113)		3	C	3
6	GL N (p17)		4	C	3
7	GL N (p18)		5	C	4
8	GL A2 (p11)		4	C	4
9	GL N (p14)		4	B	5
10	GL G (p17)		5	B	5
11	GL G (p110)		4	B	5
12	GL G (p15)		5	B	5
13	GL N (p12)		5	B	5
14	GL G (p13)		4	B	5
15	GL A2 (p17)		4	B	5
16	GL N (p13)		4	B	5
		NEM 3107	5	B	5
17	GL G (p14)		5	B	5
18	GL N (p110)		4	B	5
19	GL G (p12)		4	B	5
20	GL G (p114)		5	B	5
21	GL A2 (p18)		5	B	5
22	GL G (p115)		4	B	5
23	GL G (p11)		5	B	5
24	GL A2 (p12)		4	B	5
25	GL A2 (p14)		2	A	6
26	GL A2 (p115)		2	A	6
27	GL A2 (p111)		2	A	6

AA = aspecto agronómico; 1 = mínimo AA; 5 = máximo AA; I = idiotipo; PH = parental Hartwig; PW = parental Williams; PL = parental L87-0482; A = idiotipo A semejante a Hartwig; B = idiotipo B semejante a NEM 3107; C = idiotipo C semejante a Williams 82 y L87-0482; GC = grupo formado en el análisis de conglomerado.

Los datos obtenidos del AA muestran que el cultivar exótico Hartwig se localiza en un extremo de la variabilidad debido al bajo nivel de adaptación que expresa, mientras que el cultivar exóticos Williams 82 y la línea L87-0482 se ubicaron en posición intermedia entre este y el PR NEM 3107 que representa el extremo adaptado de la variabilidad. En este rango el 82 % de las progenies se consideraron con un nivel adecuado de adaptación (AA = 3~5). En adición, la valoración del AA de las progenies derivadas de Williams 82 y L87-0482 mostró que el 90 % de estas [GL G (p11), GL G (p12), GL G (p13), GL G (p14), GL G (p15), GL G (p17), GL G (p110), GL G (p114), GL G (p115), GL N (p12), GL N (p13), GL N (p14), GL N (p15), GL N (p17), GL N (p18), GL N (p110), GL N (p113), GL N (p115)] (Tabla 4.1), fueron clasificadas con un nivel adecuado de adaptación, mientras que solo el 57 % de las progenies derivadas de Hartwig [GL A2 (p12), GL A2 (p18), GL A2 (p17), GL A2 (p11)] se consideraron con un nivel adecuado de adaptación para ser incluidas en ECR (Figura 4.3).

Estos resultados demuestran que en programas de RC en los cuales se desea seleccionar líneas en generaciones tempranas, la eficacia para la recuperación de caracteres que expresan adaptación depende del nivel de adaptación del PD. En este sentido para el nivel de adaptación de Hartwig se necesitan tres generaciones de RC con germoplasma comercial para lograr un nivel adecuado de adaptación al menos en el 50 % de sus progenies, mientras que para el cultivares exóticos Williams 82 y la línea L87-0482 la misma cantidad de generaciones de RC generó un mayor número de progenies con un nivel adecuado de adaptación.

Si bien se considera apropiado el uso de genotipos donadores de genes de interés con un nivel de adaptación como el de Williams 82 (AA = 3) debido a que generan gran proporción de progenies adaptadas estas podrían presentar estrecha variabilidad, limitando la obtención de segregantes transgresivos para nuevos caracteres favorables. En este sentido la reducción de la cantidad de generaciones de RC en este tipo de germoplasma podría incrementar la variabilidad y la probabilidad de obtener nuevas combinaciones de genes debido a la mayor proporción de genoma exótico en las progenies. Sin embargo se considera necesario realizar estudios para determinar la relación entre los distintos niveles de adaptación

del germoplasma donante y la capacidad de generar progenies con nuevas combinaciones transgresivas de genes favorables.

Además en este trabajo fue demostrado que el AA es una valoración que combina distintas variables relacionadas con la adaptación y que pueden ser medidas a simple vista simplificando el proceso de caracterización de germoplasma y selección de progenies.

Figura 4.3. Experimento a campo en el cual se observa el nivel de adaptación logrado en la generación RC_3 .



CONCLUSIONES

Se seleccionaron siete combinaciones entre plantas homocigotas para los genes *Rhg4* y *Rpp4*, dos combinaciones para los genes *Rhg4* y *Rps1-k* y tres combinaciones para los genes *Rps1-k* y *Rpp4*, en todos los casos las combinaciones seleccionadas derivan de plantas semejantes al parental recurrente para los caracteres de adaptación evaluados.

La realización de tres generaciones de retro-cruzamientos permitió obtener un alto porcentaje de progenies con nivel adecuado de adaptación (82 %) debido principalmente al aporte de los parentales donantes Williams 82 y L87-0482, sin embargo se desconoce el potencial de este tipo de germoplasma (cultivares exóticos), para la obtención de nuevas combinaciones de genes que favorezcan el rendimiento de granos.

La valoración del AA permite clasificar el germoplasma considerando un conjunto de variables relacionadas con la adaptación que pueden ser detectadas a simple vista, simplificando la selección y evitando el descarte de plantas diferentes al PR, pero con un nivel adecuado de adaptación.

Se considera necesario estudiar la relación entre el nivel de adaptación del germoplasma exótico y el potencial para generar progenies que expresen combinaciones de genes favorables.

OBTENCIÓN DE PLANTAS DOBLE HOMOCIGOTAS PARA LOS GENES *Rgh4*, *Rps1-k* Y *Rpp4* Y EVALUACIÓN DE SUS PROGENIES FRENTE A *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi*

INTRODUCCIÓN

Selección molecular de plantas doble homocigotas

Como fue demostrado en el capítulo 3 es posible seleccionar FCNR para las regiones estudiadas de los GL A2 y GL N en poblaciones pequeñas de hasta 32 plantas; si no existen antecedente de la presencia de genes desfavorables ligados a los FCNR se considera innecesario el incremento en el tamaño de las poblaciones para evitar el efecto del arrastre por ligamiento. En este sentido la identificación de FCNR permite seleccionar genes de interés usando un único MM que puede estar localizado a una distancia que depende de la cantidad de plantas que se desean caracterizar. Debido a que estos fragmentos segregan en las poblaciones como factores mendelianos la cantidad mínima de plantas necesarias para combinar dos o más genes (FCNR) que no estén ligados puede ser estimada a través del principio de transmisión independiente como se explica en la 2ª ley de Mendel.

En la Figura 5.1 se muestra un esquema de la estrategia utilizada para la piramidación de tres genes, considerando la selección de FCNR. Para la combinación de estos se necesitan al menos dos poblaciones di-híbridas ($AaBb$ y $AaCc$) que deben compartir al menos uno de los genes de interés.

Esta estrategia permite piramidar los genes en poblaciones di-híbridas donde segregan como máximo dos genes de interés lo cual demanda poblaciones pequeñas y permite que los FCNR segreguen como factores mendelianos por ausencia de recombinación.

Evaluación de progenies para determinar la resistencia a factores bióticos

Heterodera glycines: El nematodo del quiste de la soja es un parásito que afecta a las raíces y altera el normal flujo de nutrientes en la planta, produciendo clorosis y desarrollo anormal de cultivares susceptibles (Lima *et al.*, 1992; Lordello *et al.*, 1992; Monteiro y Moraes, 1992). En Argentina fue detectado en el año 1997 con distribución en todas las regiones productoras de soja.

A nivel mundial se describieron cuatro razas de *H. glycines* y posteriormente se designaron 16 (Riggs y Schmitt, 1991) considerando la reacción del nematodo a cuatro genotipos diferenciales de soja (Peking, Pickett, PI 88788 y PI 90763), por último se obtuvo un nuevo esquema de clasificación denominado “tipo GH” en el cual se utilizan siete líneas diferenciales de soja (Peking, PI 88788, PI 90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 y PI 548316). En la Argentina han sido detectadas las razas 1, 3, 5, 9 y 14 (Baigorri *et al.*, 1998).

Phytophthora sojae: En soja la podredumbre de raíz y base del tallo es una enfermedad producida por el hongo *Phytophthora sojae* presente en el suelo y que posee alta diversidad patogénica (más de 26 razas fisiológicas).

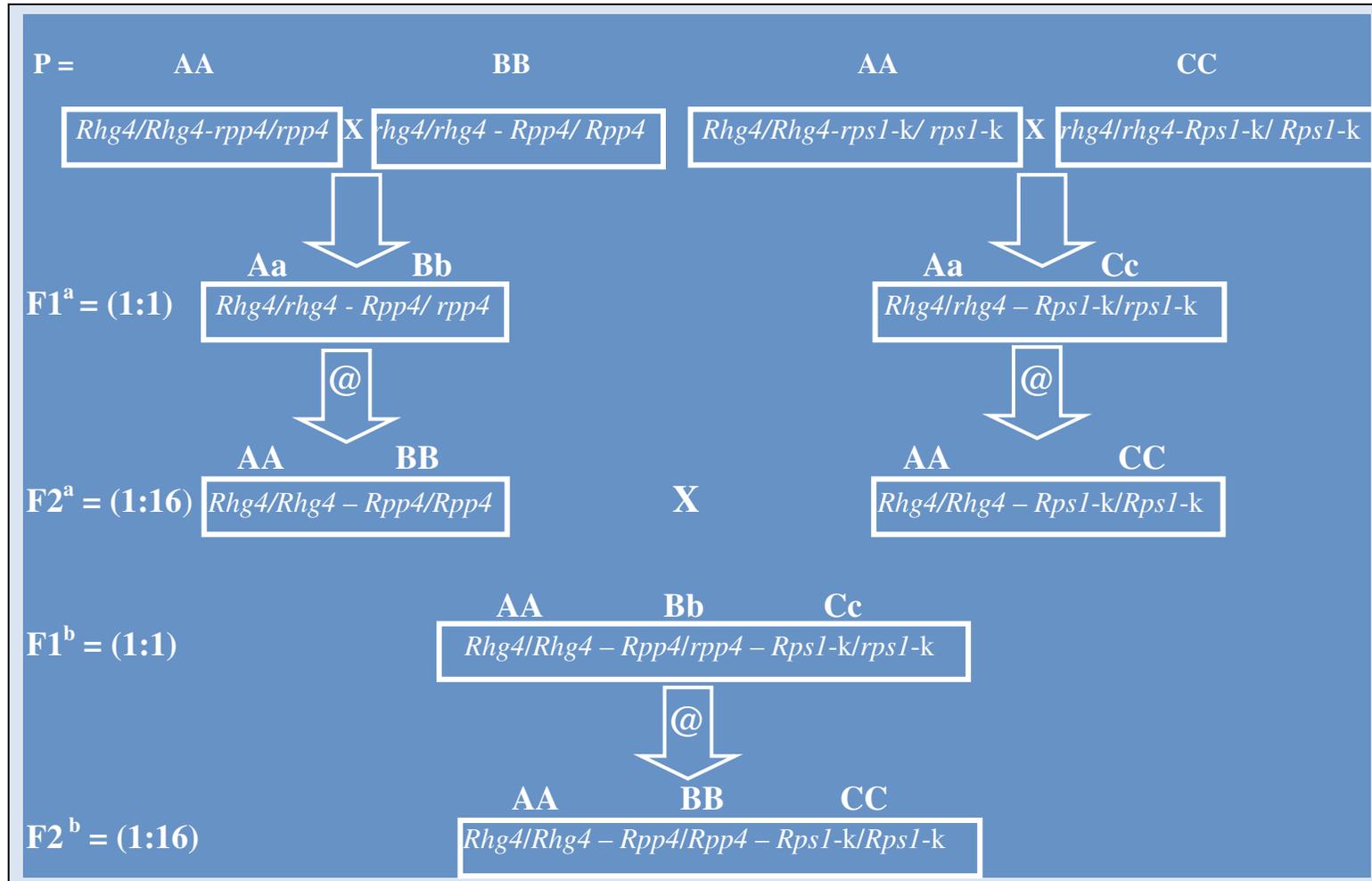
Este hongo fue identificado en Indiana (EEUU) en 1948 y actualmente posee una gran distribución a nivel mundial. En Argentina fue detectado por primera vez en campos del sur de la provincia de Santa Fe y actualmente abarca las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos, Tucumán y Salta con la presencia de las razas 1, 3 y 4.

Phakopsora pachyrhizi: La roya que afecta a la soja es causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi*, fue reportado por primera vez en Japón en 1902 y posteriormente en

varios países asiáticos (Bromfield y Hartwig, 1980), causando pérdidas de rendimiento de hasta un 80 % (Poonpolgul, 1997).

En nuestro país los primeros registros de *P. pachyrhizi* fueron en las provincias de Chaco, Misiones y Corrientes (Rossi, 2003; Ivancovich *et al.*, 2004) y en la actualidad se extiende por todas las provincias productoras de soja del centro y norte de Argentina. La resistencia genética ocurre naturalmente en distintas especies del género *Glycine* (Burdon y Marshall, 1981; Burdon, 1988) y se ve como una reacción de hipersensibilidad (RH). Este tipo de respuesta se desencadena cuando el gen de la planta resistente (R-gene) se enfrenta al gen de avirulencia del patógeno (Avr-genes) (McDowell y Simon, 2006). La expresión fenotípica de la RH se observa como una lesión de color rojo fuerte denominada *Red Bron* (RB) y se caracteriza por presentar menos esporulación que las lesión susceptibles *Tan* (TAN), también se ha identificado un tipo de reacción inmune la cual no produce lesiones visibles (Bonde *et al.*, 2006).

Figura 5.1. Esquema para la piramidación de tres genes usando poblaciones di-híbridas.



P: generación parental; AA: composición alélica del *locus Rhg4*; BB: composición alélica del *locus Rpp4*; CC: composición alélica del *locus Rps1-k*; F1^a y F2^a: combinación de tres genes en dos poblaciones di-híbridas Aa x Bb y Aa x Cc; F1^b y F2^b: combinación de tres genes en una población di-híbrida AA x Bb x Cc; () se indican las proporciones genotípicas esperadas en cada generación.

OBJETIVO

Obtener plantas doble homocigotas para las distintas combinaciones entre los genes *Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4* y evaluar sus progenies frente a *Heterodera glycines*, *Phytophthora sojae* y *Phakopsora pachyrhizi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección molecular de plantas doble homocigotas

Las progenies obtenidas de las distintas combinaciones di-híbridas entre los genes *Rhg4* x *Rpp4*, *Rhg4* x *Rps1-k* y *Rpp4* x *Rps1-k* (Tabla 3.11, 3.12 y 3.13 respectivamente) fueron caracterizadas para la selección de plantas doble homocigotas, usando los MM Satt632, AK-HSDS_{548/563}, STS-A2D8 y Satt424 para el gen *Rhg4*, Satt505, Satt288 y Satt191 para el gen *Rpp4* y Satt159, Satt009, SCAR-tgmr y Satt641 para *Rps1-k*.

Evaluación de progenies para determinar la resistencia a factores bióticos

Heterodera glycines: Las progenies derivadas de plantas doble homocigotas seleccionadas con MM fueron conducidas bajo condiciones controladas en invernáculo. Para estudiar la respuesta a la raza 3 (Riggs y Schmitt, 1988) del NQS, el experimento fue realizado en la EEA del INTA Marcos Juárez; mientras que para la raza 6, HG tipo 5,7 (Niblack *at al.*, 2002) el experimento fue realizado en la EEAOC, Las Talitas, Tucumán. Ambos ensayos fueron conducidos de acuerdo a lo propuesto por Riggs y Schmitt, (1991), con un diseño completamente al azar y siete repeticiones de una planta inoculada con 4.000 huevos + juveniles. Se utilizaron como testigos susceptibles el genotipo Lee 68 y una variedad comercial de GM VIII para las evaluaciones a la raza 3 y 6, HG tipo 5,7, respectivamente. La evaluación fue realizada 30 días después de la inoculación contando el número de hembras del NQS en raíces de cada repetición para el caso de la raza 3 y el número

de hembras juntando todas las repeticiones para la raza 6, HG Tipo 5,7; a partir de estos datos se obtuvo el índice de hembras (IH).

$$IH = \frac{\text{número de hembras en el genotipo evaluado (promedio de las repeticiones)}}{\text{Nº hembras en el cv. Testigo (promedio de las repeticiones)}} \times 100$$

Cuando el IH es inferior al 10 % la reacción es considerada negativa (-) y teniendo en cuenta el potencial reproductivo del nematodo puede considerarse al cultivar como resistente; mientras que para IH superior al 10 % la reacción es considerada positiva (+) y el genotipo puede considerarse como susceptible (Arantes *et al.*, 1999).

Phytophthora sojae: Fueron realizados tres experimentos para determinar la resistencia de las progenies seleccionadas a las razas 1, 3 y 4, siguiendo el método propuesto por Dorrance, *et al.*, (2008). Estos fueron conducidos en invernáculos del Laboratorio Agrícola Río Paraná de la localidad de San Pedro (Bs. As.) en un diseño completamente al azar con tres repeticiones de cinco plantas. Durante el estadio cotiledonar las plantas fueron inoculadas por el método de herida de hipocotilo, que consiste en un corte de 1 cm en la zona subcotiledonar de plántulas de 5~7 días y la posterior inoculación con 40 µl del patógeno crecido en medio LBAS. Las macetas se colocaron en cámara húmeda durante 18 horas y se mantuvieron a 24°C durante 5 días.

Las plantas susceptibles fueron identificadas por marchitamiento inicial seguido de muerte y las resistentes por la presencia de lesiones restringidas al sitio de inoculación (reacción de hipersensibilidad). La reacción de cada progenie fue determinada a través del promedio de plantas muertas considerando resistentes a progenies con el 25 % o menos de plantas muertas, intermedias a progenies con 26 % a 75 % de plantas muertas y susceptibles a progenies con más del 75 % de plantas muertas.

Phakopsora pachyrhizi: Se realizaron dos experimentos bajo cubierta y con riego por goteo y aspersión durante todo el ciclo de selección en la EEA del INTA Cerro Azul,

Misiones. Para la siembra se utilizó un diseño alfa en micro parcelas y seis repeticiones de cinco plantas. En el estadio vegetativo 2 se realizó la infección artificial utilizando 3×10^5 esporas de roya por mL de agua, con un rociador manual. Quince días después, el ensayo fue evaluado utilizando dos criterios: A) grado de esporulación (E), aplicando una escala donde 0 es ausencia de esporulación y 3 máxima esporulación (Morel *et al.*, 2008) y B) tipo de lesión (TL) donde las lesiones rojizas se consideraron resistentes (RB) y las lesiones marrones se consideraron susceptibles (TAN). Los datos fueron obtenidos a través de la valoración de las cinco plantas de cada repetición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección molecular de plantas doble homocigotas

Combinación de los genes *Rhg4* y *Rpp4*

De las 17 combinaciones di-híbridas obtenidas para la piramidación de los genes *Rhg4* y *Rpp4* (Tabla 3.11) se caracterizaron 25 plantas y fueron seleccionadas 14 por ser homocigotas para todos los marcadores moleculares de la región asociada al gen *Rpp4*; posteriormente estas plantas fueron caracterizadas para la región asociada al gen *Rhg4* y como resultado se identificó una planta doble homocigota (planta 1 combinación 8) por presentar los alelos del parental resistente para todos los MM en ambas regiones genómicas, (Tabla 5.1).

Si bien las plantas seleccionadas fueron homocigotas para todos los MM de la región genómica asociada al gen *Rpp4* se observaron recombinaciones en seis plantas entre los marcadores Satt505 y Satt288 y en dos plantas entre los marcadores Satt288 y Satt191 (Tabla 5.1). El estudio de progenies derivadas de plantas recombinantes para estos MM en experimentos con *P. pachyrhizi*, permitió comparar las distintas combinaciones entre los MM y la expresión del gen *Rpp4*, a fin de determinar la eficacia de cada MM para la selección de este gen.

En base a experiencias previas del grupo de mejoramiento genético de soja del INTA (De Lucia *et al.*, 2006), se considera el momento óptimo para la evaluación contra *P. pachyrhizi* cuando el nivel de esporulación del testigo susceptible está en el valor máximo ($E = 3$). En este sentido fueron realizados dos experimentos para estudiar la respuesta a *P. pachyrhizi* con las progenies seleccionadas, uno durante el período diciembre - febrero en el cual la esporulación del parental susceptible NEM 3107 se presentó inestable y con bajos niveles posiblemente por la falta de condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del hongo. Mientras que el otro experimento fue realizado durante el periodo abril - junio en el cual los niveles de esporulación fueron estables y elevados, determinándose en este período el momento óptimo para la evaluación.

En la Tabla 5.2 se muestra la respuesta a *P. pachyrhizi* de las progenies derivadas de las 14 plantas seleccionadas para la región del gen *Rpp4*. Los datos muestran que en todas las repeticiones con reacción de resistencia (RB) se observaron bajos niveles de esporulación, con valores de $E = 1$, excepto en cinco repeticiones que expresaron $E = 2$; mientras que todas las repeticiones con reacción susceptible (TAN) expresaron $E = 2$ y 3.

Para determinar la reacción de cada progenies se combinaron los datos de TL y E, seleccionando como resistentes a plantas con $TL = RB$ y $E = 1$ y 2 y como susceptibles a plantas con $TL = TAN$ y $E = 2$ y 3.

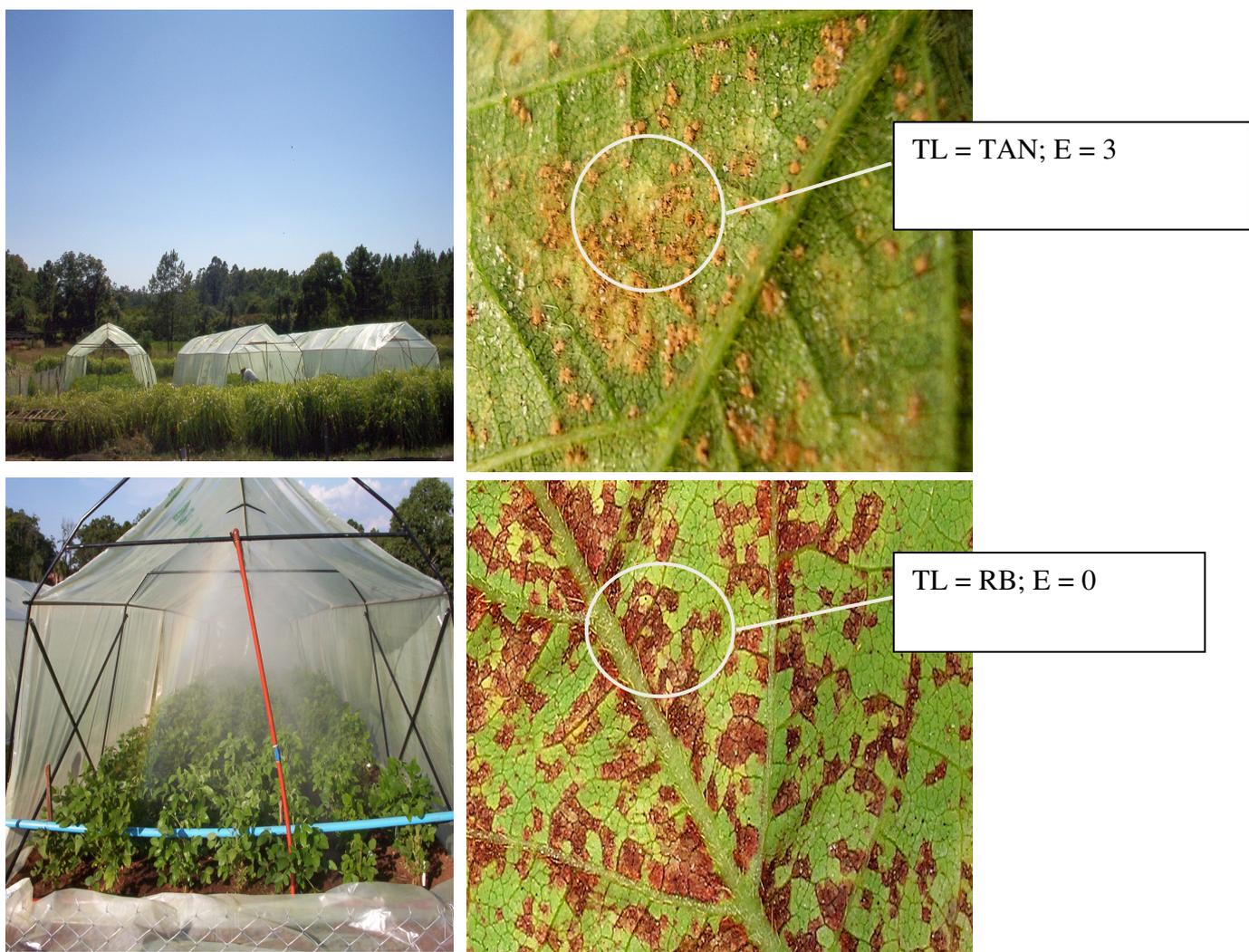
La ausencia de plantas con $E = 0$ demuestra que la variante del hongo presente en este experimento tiene la capacidad de infectar plantas que poseen el gen de resistencia *Rpp4*, esto indica que el uso masivo de este gen en campos de producción podría generar una gran presión de selección en las poblaciones del hongo produciendo el quiebre de la resistencia; sin embargo este es el único gen que ha mantenido bajos los niveles de esporulación a través de sucesivas campañas agrícolas. Para las condiciones de Argentina *Rpp4* produce reacción de hipersensibilidad en plantas infectadas permitiendo que el hongo produzca esporulación moderada y limitando los índices de severidad. Si bien no se conocen los umbrales de daño para esta enfermedad, este gen evita la senescencia precoz de las plantas infectadas y permite que las mismas completen el ciclo. En estas condiciones el gen no ejerce gran presión de

selección sobre las poblaciones del patógeno, que mantienen la variabilidad original, lo que evita la selección de variantes que puedan producir gran cantidad de esporas y senescencia precoz. Esta podría ser la estrategia por la cual este gen ha mantenido la resistencia a través de las distintas campañas agrícolas.

En la Tabla 5.1 se compara la reacción de cada progenie y la composición genética de la planta que le dio origen. Estos resultados muestran que todas las progenes que expresaron resistencia son derivadas de plantas que poseen el alelo del parental resistente para Satt288 y que la presencia de los alelos Satt505 (plantas 1 y 2 de la combinación 14) y Satt191 (plantas 1 y 2 de la combinación 16) del parental susceptible a ambos lados de este *locus* no modificó la expresión de resistencia de estas progenes. En adición, todas las progenes susceptibles fueron derivadas de plantas con el alelo del parental susceptible para Satt288, y la presencia del alelo resistente para Satt505 (plantas 1, 2, 1 y 2 de las combinaciones 6, 8, 9 y 11, respectivamente) no modificó la expresión susceptible de estas. Estos datos confirman que el gen *Rpp4* está fuertemente asociado a Satt288 y que este MM puede ser usado para la selección de este gen en poblaciones pequeñas.

En la Figura 5.2 se muestra un experimento bajo condiciones controladas en la EEA del Cerro Azul, Misiones para la evaluación de progenes de soja contra *P. pachyrhizi*.

Figura 5.2. Experimento en la EEA del INTA Cerro azul Misiones, donde se observa el envés de hojas de soja con distintos tipos de lesiones y los valores extremos del nivel de esporulación utilizado para la caracterización de las progenies.



TL: Tipo de lesión; TAN: reacción susceptible; RB: reacción resistente; E: nivel de esporulación; 0: ausencia de esporulación; 3: máxima esporulación.

Tabla 5.1. Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes *Rhg4* y *Rpp4* y reacción de sus progenies frente a *H. glycines* y *P. pachyrhizi*.

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	GL A2 – <i>Rhg4</i>					GL G – <i>Rpp4</i>			
	♀	♂		Satt632	AK-HSDS	A2D8	Satt424	R/I	Satt505	Satt288	Satt191	R/C
2	GL G (p12)	GL A2 (p18)	1	250/255	996/960	150/140	200	-	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
			2	<i>250</i>	<i>996</i>	<i>150</i>	200	S	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
6	GL G (p14)	GL A2 (p17)	1	255	960	140	200	S	<i>180</i>	250	230	TAN
			2	255	960	140	200	-	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
8	GL A2 (p18)	GL G (p14)	1	<i>250</i>	<i>996</i>	<i>150</i>	<i>245</i>	S	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
			2	<i>250</i>	<i>996</i>	<i>150</i>	<i>245</i>	-	<i>180</i>	250	230	TAN
9	GL A2 (p17)	GL G (p110)	1	250/255	275/280	996/960	150/140	-	<i>180</i>	250	230	TAN
			2	255	960	140	200	-	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
11	GL G (p11)	GL A2 (p17)	1	255	275/280	996/960	150/140	-	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
			2	255	275/280	996/960	150/140	-	<i>180</i>	250	230	TAN
14	GL A2 (p17)	GL G (p15)	1	255	960	140	200	-	160	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
			2	255	960	140	200	-	160	<i>200</i>	<i>255</i>	RB
16	GL G (p17)	GL A2 (p17)	1	250/255	275/280	996/960	150/140	-	<i>180</i>	<i>200</i>	230	RB
			2	250/255	275/280	996/960	150/140	-	<i>180</i>	<i>200</i>	230	RB

R/I: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *H. glycines* en invernáculo; R/C: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *P. pachyrhizi* a campo; en cursiva se indican los alelos del parental resistente; en negrita se indican los alelos del parental susceptible; AK-HSDS: AK-HSDS_{548/563}.

Tabla. 5.2. Reacción de las progenies seleccionadas para la piramidación de los genes *Rhg4* y *Rpp4* frente a *P. pachyrhizi*.

Nº	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies F _{2:3}											
	♀	♂		TL				E							
				R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
2	GL G (p12)	GL A2 (p18)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1
6	GL G (p14)	GL A2 (p17)	1	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	3	3
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	2	1	1	1	1
8	GL A2 (p18)	GL G (p14)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1
			2	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	2	2	3	3	3
9	GL A2 (p17)	GL G (p110)	1	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	2	3	3
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	2	1
11	GL G (p11)	GL A2 (p17)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1
			2	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	2	2	3
14	GL A2 (p17)	GL G (p15)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	2	1	1	1
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	2
16	GL G (p17)	GL A2 (p17)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	2	1	1	1	1
	NEM 3107			TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	3	3
	L87-0482			RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1

TL: tipo de lesión; E: nivel de esporulación; R1-6: repeticiones 1-6; RB: reacción resistente; TAN: reacción susceptible.

Para la región genómica asociada al gen *Rhg4*, de las 14 plantas caracterizadas (Tabla 5.1) ocho fueron homocigotas para todos los MM, el resto heterocigotas excepto la planta 1 de la combinación 2 homocigota para Satt424 y las plantas 1 y 2 de la combinación 11 homocigota para Satt632.

Para las evaluaciones frente a *H. glycines* (Figura 5.3) se seleccionaron tres progenies derivadas de plantas homocigotas con distinta composición alélica para esta región genómica (Tabla 5.1). Una de las progenies corresponde a la planta seleccionada como doble homocigota (planta 1 de la combinación 8) y presenta los alelos del parental resistente para todos los MM de esta región genómica, otra progenie fue seleccionada por presentar los alelos del parental susceptible para todos los MM (planta 1 de la combinación 6), mientras que la última progenie fue seleccionada por ser recombinante entre el FCNR (AK-HSDS_{548/563} + STS-A2D8) y Satt424, presentando los alelos del parental resistente para todos los MM, excepto para Satt424, homocigota para el alelo del parental susceptible (planta 2 de la combinación 2). Debido a que no fueron detectadas progenies con recombinación entre el FCNR (AK-HSDS_{548/563} + STS-A2D8) y Satt632, estas no fueron incluidas en las evaluaciones contra *H. glycines*.

Como se muestra en la Tabla 5.3 todas las progenies estudiadas para ambas razas mostraron valores de IH > 10 % por lo que fueron clasificadas como susceptibles. Estos resultados podrían indicar que el gen *Rhg4* está localizado en otra región genómica ya que se descarta la posibilidad de que el mismo se haya perdido por recombinación durante el proceso de selección, debido a la baja probabilidad de que ocurra un doble recombinante en una región genómica tan pequeña (4,8 cM). Sin embargo existen antecedentes que confirman la posición del *locus* en esta región del genoma (Matson y Williams, 1965; Matthews *et al.*, 1998).

En este sentido los resultados obtenidos podrían deberse a algún tipo de interacción génica entre los genes *Rhg4* y *rhg1* del genotipo Hartwig, al menos para la raza 3, como fue mencionado por Meksem *et al.* (1998) para el genotipo Forrest. Sin embargo no se conoce que tipo de interacción ocurre entre estos genes.

En la Tabla 5.3 se observa que el genotipo susceptible Lee 68 y la progenie con los alelos del parental susceptible (planta 1 de la combinación 6) presentan valores de IH 34,2 % y 12,7 % superiores respectivamente al valor de IH de la progenie con alelos del parental resistente para todos los MM (planta 1 de combinación 8). Estas diferencias de más del 10 % entre las progenies con y sin el genes *Rhg4* podrían ser atribuidas al aporte del gen *Rhg4* que en presencia de *rhg1* interactúan aditivamente y controlan el 90 % de la variabilidad que expresa este carácter. Sin embargo serán necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado para el caso de la raza 6 HG tipo 5,7 se observa que entre las progenies con y sin el gen *Rhg4* las diferencias entre los IH no superan el 10 % por lo cual se descarta que este gen aporte efecto aditivo al menos para la resistencia esta raza.

Figura 5.3. Experimento en invernáculo para evaluar la resistencia a la raza 3 de *H. glycines*.



A = plantas inoculadas con huevos y larvas de NQS provenientes de hembras extraídas de raíces de soja susceptible; B = hembras de NQS en las raíces de soja susceptible; C = quistes de NQS (hembras maduras).

Tabla 5.3. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes *Rhg4* y *Rpp4* frente a *H. glycines*.

	N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies NHR							X	DE	IH	R
		♀	♂												
					R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7				
	2	GL G (p12)	GL A2 (p18)	2	40	33	54	70	21	10	15	34,5	21,7	60,0	S
Raza 3	6	GL G (p14)	GL A2 (p17)	1	63	40	34	80	15	44	40	45,0	20,8	78,5	S
	8	GL A2 (p18)	GL G (p14)	1	12	28	20	64	60	42	38	37,7	19,4	65,8	S
		Lee68			70	66	81	35	48	71	30	57,3	19,6	100	S
	2	GL G (p12)	GL A2 (p18)	2	-	-	-	-	-	-	-	472,71		89,79	S
Raza 6 HG	6	GL G (p14)	GL A2 (p17)	1	-	-	-	-	-	-	-	498,86		94,76	S
Tipo 5,7	8	GL A2 (p18)	GL G (p14)	1	-	-	-	-	-	-	-	507,71		96,44	S
		TS			-	-	-	-	-	-	-	526,43		100	S

R1~7: repeticiones 1~7; TS: testigo susceptible (variedad comercial de GM VIII); NHR: número de hembras de *H. glycines* en raíces; X: promedio de hembras; DE: desvío estándar; IH: índice de hembras; R: reacción; S: susceptible.

Combinación de los genes *Rhg4* y *Rps1-k*

De las seis combinaciones obtenidas para la piramidación de los genes *Rhg4* y *Rps1-k* (Tabla 3.12) fueron caracterizadas 18 plantas de las cuales se seleccionaron ocho por ser homocigotas para todos los MM de la región asociada al gen *Rps1-k*. Posteriormente estas plantas fueron caracterizadas para la región asociada al gen *Rhg4* (Tabla 5.4). La comparación de la caracterización molecular entre ambas regiones genómicas permitió identificar una planta doble homocigota con alelos del parental resistente para todos los MM asociados a los genes *Rhg4* y *Rps1-k* (planta 2 combinación 1).

Para la región genómica asociada al gen *Rps1-k* todas las plantas presentaron los alelos del parental resistente para todos los MM, excepto seis de estas en las cuales se observó el alelo del parental susceptible para Satt641 por recombinación entre este y el FCNR (Satt009 + SCAR-tgmr) (Tabla 5.4).

De las ocho plantas caracterizadas con MM se evaluaron la reacción de seis progenies a las razas 1, 3 y 4 de *P. sojae*. Como se muestra en la Tabla 5.5 para la reacción a la raza 1 todas las progenies y los parentales fueron resistentes, incluso NEM 3107 lo cual indica que la resistencia a esta raza se expresa por un gen diferente a *Rps1-k* ausente en este genotipo. Estos resultados podrían ser explicados si se considera que la raza 1 de *P. sojae* fue la primer variante de este hongo detectada en Argentina (Distefano y Salines, 2002) y debido a que la misma es controlada por casi todos los genes de resistencia presentes en el germoplasma de soja (Robertson, 2004), es probable que muchos cultivares comerciales actuales incluyendo los parentales que dieron origen a NEM 3107 posean distintos genes para el control de esta raza, razón por la cual NEM 3107 podría haber heredado la resistencia.

Por otro lado en la Tabla 5.5 se presentan las evaluaciones a las razas 3 (Figura 5.4) y 4 de *P. sojae*. En ambos casos se observaron reacciones susceptibles en todas las progenies con alelos del parental susceptible para Satt641, mientras que fueron resistentes las progenies con alelos del parental resistente para todos los MM (Tabla 5.4). Estos resultados muestran que la selección del FCNR (SCAR-tgmr + Satt009) no implica la selección del gen *Rps1-k* ya

que este se localiza entre el FCNR (SCAR-tgmr + Satt009) y Satt641. Estos datos coinciden con resultados de mapeo genético obtenidos por Bhattacharyya *et al.* (1997) quien demostró que *RpsI-k* se localiza entre SCAR-tgmr y Satt641, lo cual confirma la posición del gen y valida el uso de los MM localizados en esta región genómica para la selección del mismo. En este sentido se determinó que SCAR-tgmr y Satt009 están estrechamente ligados y que entre ambos no se produjo recombinación por lo cual ambos co-segregaron siempre juntos como un FCNR, pero sin el gen *RpsI-k*. Además, como se muestra en la Tabla 5.4 para la región genómica en la cual se localiza *RpsI-k* se observaron seis recombinaciones, lo cual indica que esta región (SCAR-tgmr + Satt009 + Satt641) no se hereda en bloque como un FCNR.

Considerando estos resultados se deberán probar otros MM en esta posición del genoma para detectar un nuevo FCNR que co-segregue con el gen *RpsI-k* a fin de poder seleccionar este gen con un único MM y simplificar el método. No obstante a partir de estos resultados se confirmó la posición de *RpsI-k* lo cual permite asegurar la selección del mismo usando MM a ambos lados de este gen; como ya fue mencionado es más eficiente el uso de SCAR-tgmr que Satt009 por lo cual se recomienda priorizar el uso de este MM junto a Satt641 para la selección de *RpsI-k*.

Por otro lado la caracterización molecular de la región genómica asociada al gen *Rhg4* (Tabla 5.4) mostró cuatro plantas heterocigotas para todos los MM y tres homocigotas con alelos del parental susceptible en todos los MM, excepto una planta con el alelo del parental resistente para Satt424 por recombinación entre este y STS-A2D8. Además, como ya fue mencionado, se identificó una planta doble homocigota (planta 2 combinación 1) con alelos del parental resistente para las dos regiones genómicas de interés (*Rhg4* y *RpsI-k*).

Para las evaluaciones frente a *H. glycines* fueron seleccionadas dos progenies, una derivada de la planta doble homocigota (planta 2 combinación 1) y la otra por presentar los alelos del parental susceptible para todos los MM de la región asociada al gen *Rhg4* (planta 3 de la combinación 3). En la Tabla 5.6 se presenta la respuesta a las Razas 3 y 6 HG tipo 5,7 de *H. glycines* donde se observa que ambas progenies expresaron valores de IH > 10 % y fueron clasificadas como susceptibles para las dos razas estudiadas. Como ya fue mencionado, es

posible que la ausencia de resistencia en progenies que poseen el gen *Rhg4* se deba a un tipo de interacción génica entre *Rgh4* y *rhg1*.

Para la respuesta a la raza 3 la comparación entre los IH del testigo susceptible Lee 68 y la progenie derivada de la planta doble homocigota mostro una diferencia de 11,2 %, sin embargo la comparación entre progenies con y sin el gen *Rhg4* mostro diferencia de menos del 10 %. Este resultado podría indicar que la interacción entre estos dos genes no es de tipo aditiva y que las diferencias observadas del IH entre las progenies con y sin el gen *Rhg4* podrían deberse a errores experimentales si se consideran elevados los DE (Tabla 5.3 y 5.6). Si bien estos valores de DE son considerados normales en experimentos para determinar resistencia total al NQS, para la cuantificación de efectos aditivos en los cuales se necesita conocer el aporte de cada gen al carácter de interés, estos experimentos deberán ser ajustados a fin de disminuir el error experimental.

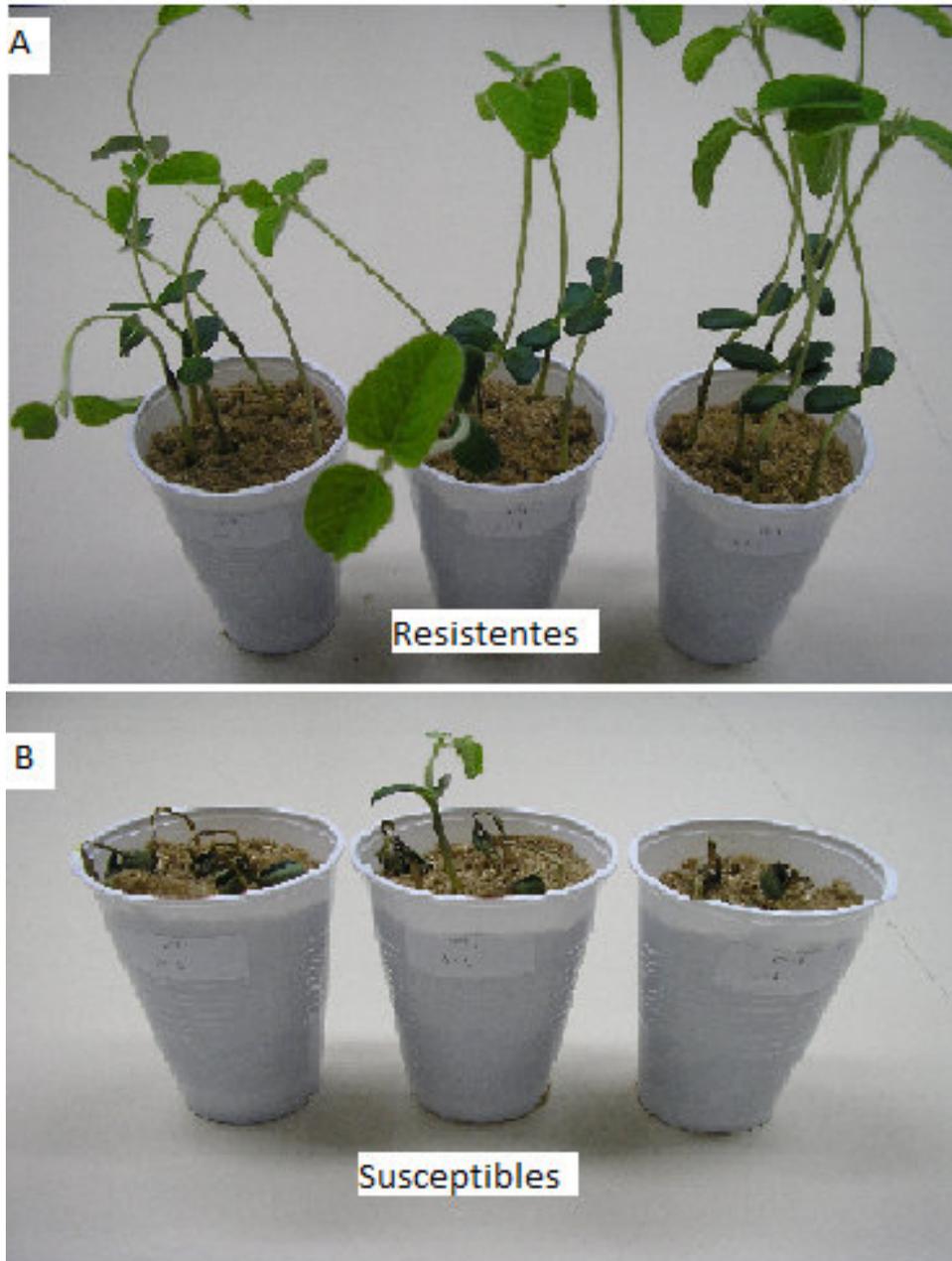
Considerando los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados frente al NQS y que el gen *Rhg4* fue incorporado a las progenies seleccionadas la ausencia de resistencia en estas, podría deberse a algún tipo de interacción epistática entre *Rhg4* y *rhg1*, en este caso deberían estar presentes ambos genes para la expresión de la resistencia al menos cuando se usa el genotipo Hartwig como parental resistente.

Si bien no se lograron genotipos con resistencia al NQS se destaca la incorporación del gen *Rhg4* derivado de Hartwig como un aporte de variabilidad exótica al germoplasma adaptado debido a que el germoplasma comercial argentino no presenta resistencia a *H. glycines* derivada de Hartwig (Guillin *et al.*, 2003). En este sentido el gen *Rhg4* incorporado en este trabajo al germoplasma adaptado deberá ser combinado con el gen *rhg1* para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes lo cual permitirá profundizar los estudios de interacción entre ambos genes.

Existen algunos antecedentes (Concibido *et al.*, 2004) que sugieren que el gen *rhg1* está estrechamente ligado a genes desfavorables para el rendimiento de granos, por este motivo y a fin de evitar el desarrollo de grandes poblaciones como estrategia para romper el

arrastre por ligamiento, en este trabajo se incorporó solamente el gen *Rhg4* del genotipo Hartwig, mientras que el gen *rhg1* será combinado con este usando como PD genotipos comerciales que poseen *rhg1*.

Figura 5.4. Reacción de progenies frente a la raza 3 de *P. sojae* a 5 días de la inoculación.



A= reacción de resistencia; B= reacción de susceptibilidad

Tabla 5.4. Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes *Rhg4* y *Rps1-k* y reacción de sus progenies frente a *H. glycines* y *P. sojae*.

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	GL N – <i>Rhg4</i>					GL G – <i>Rps1 - k</i>				
	♀	♂		Satt632	AK-HSDS	A2D8	Satt424	R/I	Satt159	SCAR-tgmr	Satt009	Satt641	R/I
1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	1	<i>250/255</i>	<i>996/960</i>	<i>150/140</i>	<i>245/200</i>	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	<i>360</i>	R
			2	<i>275</i>	<i>996</i>	<i>150</i>	<i>245</i>	S	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	<i>360</i>	R
			3	255	960	140	200	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S
			4	<i>250/255</i>	<i>996/960</i>	<i>150/140</i>	<i>245/200</i>	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S
3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	1	<i>250/255</i>	<i>996/960</i>	<i>150/140</i>	<i>245/200</i>	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	-
			2	255	960	140	<i>245</i>	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S
			3	255	960	140	200	S	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	-
			4	<i>250/255</i>	<i>996/960</i>	<i>150/140</i>	<i>245/200</i>	-	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S

R/I: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *H. glycines* y *P. sojae* ; R/I: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *H. glycines* en invernáculo; en cursiva se indican los alelos del parental resistente; en negrita se indican los alelos del parental susceptible; AK-HSDS: AK-HSDS_{548/563}.

Tabla 5.5. Reacción de las progenies seleccionadas para la piramidación de los genes *Rhg4* y *Rps1-k* frente a las razas 1, 3 y 4 de *P. sojae*.

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies F _{2:3}			X	Reacción	
	♀	♂		% PM					
				R1	R2	R3			
Raza1	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	1	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	2	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	3	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	4	20	0	0	6,66	R
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	2	20	0	0	6,66	R
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	4	0	0	0	0	R
			NEM 3107		0	0	0	0	R
			Williams 82		0	0	0	0	R
			TR		0	0	0	0	R
			TS		100	100	100	100	S
Raza3	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	1	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	2	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	3	100	100	100	100	S
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	4	100	80	100	93,33	S
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	2	100	100	80	93,33	S
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	4	100	80	100	93,33	S
			NEM 3107		100	100	100	100	S
			Williams 82		0	0	0	0	R
			TR		20	20	0	13,33	R
			TS		60	100	100	86,66	S
Raza4	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	1	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	2	0	0	0	0	R
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	3	100	100	100	100	S
	1	GL A2 (p17)	GL N (p13)	4	100	80	100	93,33	S
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	2	100	100	80	93,33	S
	3	GL N (p13)	GL A2 (p18)	4	100	80	100	93,33	S
			NEM 3107		100	100	100	100	S
			Williams 82		33,33	0	0	11,11	R
			TR		0	0	0	0	R
			TS		75	100	80	85	S

TR: testigo resistente; TS: testigo susceptible; R1~3: repeticiones 1~3; % PM: porcentaje de plantas muestras; X: promedio de % PM; R: resistente; S: susceptible.

Tabla 5.6. Reacción de las progenies seleccionadas para la piramidación de los genes *Rhg4* y *Rps1-k* frente a *H. glycines*.

	N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies F _{2:3}							X	DE	IH	R
		♀	♂		NHR										
					R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7				
Raza3	1	GL A2 (pl7)	GL N (pl3)	2	73	29	68	56	19	41	70	50,8	28,7	88,6	S
	3	GL N (pl3)	GL A2 (pl8)	3	23	44	74	29	16	88	74	49,7	28,7	86,7	S
			Lee 68			70	66	81	35	48	71	30	57,3	19,6	100
Raza 6 HG	1	GL A2 (pl7)	GL N (pl3)	2	-	-	-	-	-	-	-	545,29		103	S
Tipo 5,7	3	GL N (pl3)	GL A2 (pl8)	3	-	-	-	-	-	-	-	576,43		109	S
			TS		-	-	-	-	-	-	-	526,43		100	S

R1~7: repeticiones 1~7; TS: testigo susceptible (variedad comercial de GM VIII); NHR: número de hembras de *H. glycines* en raíces; X: promedio de hembras de *H. glycines*; IH: índice de hembras; S: susceptible; DE: desvío estándar.

Combinación de los genes *Rpp4* y *Rps1-k*

De las ocho combinaciones obtenidas para la piramidación de los genes *Rpp4* y *Rps1-k* (Tabla 3.13) se presenta la composición alélica en pares de bases (pb) de ocho plantas derivadas de estas por ser homocigotas para todos los MM de la región del gen *Rpp4* (Tabla 5.7). Posteriormente estas plantas fueron caracterizadas para la región genómica asociada al gen *Rps1-k*. Como resultado de la caracterización molecular se obtuvo una planta doble homocigota con alelos del parental resistente para todos los MM de las dos regiones genómicas de interés (planta 1 combinación 1).

Para la región genómica asociada al gen *Rpp4* se obtuvieron cuatro plantas con alelos del parental susceptible y tres con alelos del parental resistente para todos los MM, mientras que una planta presentó alelos del parental susceptibles para Satt191 y Satt288 y resistente para Satt505 por recombinación entre Satt505 y Satt288. En la Tabla 5.8 se presenta la reacción de estas ocho progenies como respuesta a la infección con *P. pachyrhizi*, las tres progenies con alelos del parental resistente para todos los MM expresaron resistencia, mientras que el resto de las progenies fueron susceptibles incluyendo la progenie recombinante lo cual confirma la estrecha asociación entre *Rpp4* y Satt288.

En la Tabla 5.7 se presenta la composición alélica para la región genómica asociada al gen *Rps1-k* donde se observa que tres plantas fueron heterocigotas para todos los MM, excepto una de estas que fue homocigota para el marcador Satt641 por recombinación entre este y el FCNR (SCAR-tgmr + Satt009). Dos plantas fueron homocigotas para los alelos del parental susceptible en todos los MM de esta región, mientras que las tres plantas restantes fueron homocigotas resistentes para todos los MM, excepto dos de estas que presentaron el alelo susceptible de Satt641 por recombinación entre este y el FCNR (SCAR-tgmr + Satt009).

Para la evaluación contra *P. sojae* (Tabla 5.9) de las ocho progenies caracterizadas se seleccionaron cuatro por ser homocigotas para todos los MM, dos de estas fueron seleccionadas por ser recombinantes entre el FCNR (SCAR-tgmr + Satt009) y Satt641, mientras que las dos restantes por presentar alelos del parental susceptible y resistente para

todos los MM, respectivamente. Todas las progenies y los dos genotipos parentales (NEM 3107 y Williams 82) expresaron resistencia a la raza 1, mientras que para las razas 3 y 4 todas las progenies fueron susceptibles, excepto las progenies con alelos del parental resistente para todos los MM. Como fue mencionado anteriormente la presencia del alelo del parental susceptible para Satt641 determina reacción de susceptibilidad a las razas 3 y 4, confirmando el estrecho ligamiento genético entre este marcador y el gen *Rps1-k*.

Tabla 5.7. Composición alélica según el tamaño en pb de cada fragmento amplificado en las plantas seleccionadas para la pirimidación de los genes *Rpp4* y *Rps1-k* y reacción de sus progenies frente a *P. pachyrhizi* y *P. sojae*.

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	GL G – <i>Rpp4</i>				GL N – <i>Rps1 - k</i>				
	♀	♂		Satt505	Satt288	Satt191	R/C	Satt159	SCAR-tgmr	Satt009	Satt641	R/I
1	GL G (p11)	GL N (p13)	1	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	R	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	<i>360</i>	R
			2	160	250	230	S	<i>300/275</i>	<i>400/_</i>	<i>175/250</i>	340	-
			3	160	250	230	S	<i>300/275</i>	<i>400/_</i>	<i>175/250</i>	360/340	-
			4	160	250	230	S	<i>300/275</i>	<i>400/_</i>	<i>175/250</i>	360/340	-
2	GL G (p14)	GL N (p13)	1	<i>180</i>	250	230	S	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S
			2	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	R	275	-	250	340	-
			3	<i>180</i>	<i>200</i>	<i>255</i>	R	275	-	250	340	S
3	GL N (p13)	GL G (p13)	1	160	250	230	S	<i>300</i>	<i>400</i>	<i>175</i>	340	S

R/C: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *P. pachyrhizi* a campo; R/I: reacción de las progenies F_{2,3} frente a *P. sojae* en invernáculo; en cursiva se indican los alelos del parental resistente; en negrita se indican los alelos del parental susceptible.

Tabla. 5.8. Reacción de las progenies seleccionadas para la piramidación de los genes *Rpp4* y *Rps1-k* frente a *P. pachyrhizi*

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies F _{2:3}											
	♀	♂		TL						E					
				R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	GL G (p11)	GL N (p13)	1	RB	RB	RB	RB	RB	RB	2	1	1	1	1	2
			2	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	3	3
			3	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	2	2
			4	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	2	2	3	3	2	2
2	GL G (p14)	GL N (p13)	1	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	2	2	3	3	3
			2	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	2	1
			3	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	2	1	1	1
11	GL G (p11)	GL A2 (p17)	1	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	3	3
		NEM 3107	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	TAN	3	3	3	3	3	3	
		L87-0482	RB	RB	RB	RB	RB	RB	1	1	1	1	1	1	

TL: tipo de lesión; E: nivel de esporulación; R1~6: repeticiones 1~6; RB: reacción resistente; TAN: reacción susceptible.

Tabla 5.9. Reacción de las progenies seleccionadas para la pirimidación de los genes *Rpp4* y *Rps1-k* frente a las razas 1, 3 y 4 de *P. sojae*.

N°	Combinación (F ₁)		Planta (F ₂)	Progenies F _{2,3}			X	Reacción	
	♀	♂		% PM					
				R1	R2	R3			
Raza1	1	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	0	0	0	0	R
	2	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	0	0	0	0	R
	2	GL G (pl4)	GL N (pl3)	3	0	0	0	0	R
	3	GL N (pl3)	GL G (pl3)	1	0	0	0	0	R
			NEM 3107		0	0	0	0	R
			Williams 82		0	0	0	0	R
			TR		0	0	0	0	R
		TS		100	100	100	100	S	
Raza3	1	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	0	0	0	0	R
	2	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	100	60	75	78,33	S
	2	GL G (pl4)	GL N (pl3)	3	100	100	100	100	S
	3	GL N (pl3)	GL G (pl3)	1	100	100	100	100	S
			NEM 3107		100	100	100	100	S
			Williams 82		15	0	0	0	R
			TR		20	20	0	13,33	R
		TS		60	100	100	86,66	S	
Raza4	1	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	25	0	0	8,3	R
	2	GL G (pl1)	GL N (pl3)	1	100	100	60	86,66	S
	2	GL G (pl4)	GL N (pl3)	3	100	100	100	100	S
	3	GL N (pl3)	GL G (pl3)	1	100	100	100	100	S
			NEM 3107		100	100	100	100	S
			Williams 82		0	0	0	0	R
			TR		0	0	0	0	R
		TS		75	100	80	85	S	

TR: testigo resistente; TS: testigo susceptible; R1~3: repeticiones 1~3; % PM: porcentaje plantas muestras; X: promedio de % PM; R: resistente; S: susceptible.

En esta etapa del proceso de mejoramiento fueron caracterizadas un total de 30 plantas F₂ para las tres combinaciones (*Rhg4/Rpp4*, *Rhg4/Rps1-k* y *Rpp4/Rps1-k*) y se obtuvieron 218 datos moleculares para la identificación de una planta doble homocigota para cada una de estas combinaciones. Esto indica que analizando un número reducido de plantas es posible identificar genotipos doble homocigotas lo que justifica la estrategia de piramidar genes en poblaciones di-híbridas.

Además como ya fue mencionado, la detección de FCNR que contengan genes de interés permite disminuir la cantidad MM utilizados para la selección de plantas doble homocigotas lo que hace que el método sea menos costoso. Sin embargo la obtención de un número reducido de plantas doble homocigotas como base genética para la obtención de nuevos cultivares podría limitar la variabilidad genética disponible (capítulo 4). En este sentido se deberán realizar experimentos adicionales a fin de determinar si las progenies dobles homocigotas obtenidas como resultado de este método poseen variabilidad suficiente para generar nuevas combinaciones exóticas de genes que beneficien el rendimiento de granos aportando nuevos caracteres de importancia agronómica al germoplasma comercial de soja.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres plantas doble homocigotas que combinan los genes *Rhg4* y *Rpp4* y resistencia a *P. pachyrhizi*, los genes *Rhg4* y *Rps1-k* y resistente a *P. sojae* y los genes *Rpp4* y *Rps1-k* y resistente a *P. pachyrhizi* y *P. sojae*, lo cual demuestra la eficacia de la metodología utilizada y la factibilidad del uso de germoplasma exótico como rutina para la obtención de líneas pre-comerciales de soja.

El MM Satt288 fue eficiente para la selección del gen *Rpp4* en poblaciones pequeñas di-híbridas derivadas de RC. En este caso este MM ha sido ampliamente utilizado para la selección del gen *Rpp4* en grandes poblaciones de cría del programa de mejoramiento genético de soja del INTA, lo cual lo hace adecuado para la selección de la resistencia a *P. pachyrhizi* en distintos tipos de poblaciones.

Se confirmó la posición del gen *Rps1-k* entre el MM Satt641 y el FCNR SCAR-tgmr + Satt009. Si bien se determinó una estrecha asociación de este gen y el MM Satt641 en poblaciones pequeñas, no se conoce la distancia entre ambos por lo que podrían ocurrir recombinaciones y la pérdida del gen por selección de Satt641 en poblaciones de mejoramiento de gran tamaño. Esto implica la necesidad de utilizar dos MM (SCAR-tgmr y Satt641 o Satt009 y Satt641) para asegurar la selección de la resistencia a *P. sojae* en futuros trabajos de piramidación de genes y selección en poblaciones de mejoramiento genético.

No se determinó la eficacia de los MM para la selección del gen *Rhg4*, sin embargo la región genómica asociada a este gen fue incorporada al germoplasma adaptado lo cual aporta nueva variabilidad para el control de *H. glycines*.

Se determinó que la resistencia del PR NEM 3107 a la raza 1 de *P. sojae* se expresó por un gen diferente a *Rps1-k*; lo presencia de ambos genes en los genotipos obtenidos en este trabajo aporta mayor variabilidad para afrontar nuevas variantes de este hongo.

CONCLUSIONES GENERALES

Ante la necesidad de capitalizar las biotecnologías desarrolladas en los últimos tiempos para el cultivo de soja en este trabajo se implementó un método que combina técnicas tradicionales y moleculares para el uso como rutina en programas de mejoramiento genético. Para lograr este objetivo la estrategia utilizada no solo consideró aspectos técnicos, sino también la factibilidad del uso de MM medido como las capacidades de genotipado de los programas de mejoramiento genético, además de aspectos comerciales como la necesidad de recambio varietal, considerando como principal objetivo el rendimiento de granos. En este sentido se implementó el uso de germoplasma exótico con el doble propósito de obtener resistencia a factores bióticos y nuevas combinaciones de genes que puedan ser seleccionadas en genotipos transgresivos para el rendimiento de granos.

Se aplicó SAM para incorporar genes exóticos de interés al germoplasma adaptado usando un sistema de retro-cruzamientos modificado en el cual se priorizó la recuperación de los principales caracteres de adaptación del parental recurrente en experimento a campo a fin de mantener la mayor proporción posible de genoma exótico. Se demostró que el 57 % de las progenies derivadas de Hartwig y el 90 % de las progenies derivadas Williams 82 y L87-0482 expresaron caracteres de adaptación para ser incluidas directamente en ECR. Estos resultados indican que el germoplasma exótico puede ser categorizado en distintos niveles de adaptación a fin de predecir la cantidad de generaciones de RC que son necesarias para lograr al menos un 50 % de progenies adaptadas.

Se piramidaron los genes combinando plantas homocigotas (para cada gen) derivadas de RC₃. Se obtuvieron todas las combinaciones posibles entre los tres genes de interés en distintas poblaciones di-híbridas pero con al menos uno de los genes en común entre estas. Esta estrategia permite piramidar más de dos genes realizando SAM siempre en poblaciones di-híbridas lo cual reduce el tamaño de las mismas facilitando el uso de MM en términos de costo y capacidad operativa.

Como resultado general del trabajo se obtuvieron plantas doble homocigotas que combinan los genes de interés de a pares, caracteres para adaptación y variabilidad exótica que podrá ser seleccionada en ECR para la selección de caracteres de importancia agronómica en soja.

FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO

Se deberá realizar un nuevo ciclo de cruzamientos para la combinación de los tres genes de interés (*Rhg4*, *Rps1-k* y *Rpp4*) en una misma planta.

Se deberán realizar ECR de líneas derivadas de las plantas dobles y triples homocigotas, a fin de determinar si la estrategia utilizada en este trabajo es adecuada para la identificación de genotipos transgresivos para caracteres de importancia agronómica y/o rendimiento de granos.

Se propone realizar experimentos a campo para categorizar el germoplasma exótico en distintos niveles de adaptación, a través de la valoración visual de AA.

Se propone identificar o desarrollar nuevos MM entre el FCNR (SCAR-tgmr + Satt009) y Satt 641 a fin de encontrar un nuevo FCNR que contenga al gen *Rps1-k* para la selección del mismo a través de un único MM.

BIBLIOGRAFÍA

- Allard R. W. 1960. Theoretical Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons, New York. USA. 247 pp.
- Allen D. J. 1983. The Pathology of Tropical Food Legumes: Disease Resistance in Crop Improvement, John Wiley & Sons, Chichester. UK. 428 pp.
- Alzate-Marin A. L., Cervigni G. D. L., 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* 30:333-342.
- Anand S. C. and Gallo K. M. 1984. Identification of additional soybean germplasm with resistance to race 3 of soybean cyst nematode. *Plant Dis.* 68:593-595.
- Anand S. C. 1985. Sources of resistance to the soybean cyst nematode. En: F. Lamberti & C.E. Taylor (ed.). Plenum Press, New York. 276 pp.
- Anand S. C. 1992. Registration of 'Hartwig' soybean. *Crop Science.* 32:1069-1070.
- Anderson T. R. and Buzzell R. I. 1992. Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora rot* of soybean. *Plant Dis.* 76:958-959.
- Arantes N. E., Kiihl R. A. S. & Almeida L. A. 1999. Melhoramento genético visando a resistência. En: Silva J. F. V. (ed.). O nematóide de cisto da soja: a experiencia brasileira. Sociedade Brasileira de Nematologi. Brasil, pp 132.
- Babu R., Nair S. K., Prasanna B. M. and Gupta H. S. 2004. Integrating marker-assisted selection in crop breeding – Prospects and challenges. *Current Science*, 87:5-10.
- Baigorri H., Serrano R., Bacigalupo S., Bodrero M., Gamundi J. C., Lago M., Lorenzatti S. y Cap G. 1998. Detección del nematodo del quiste de la soja en la región núcleo sojera argentina. III Reunión Nacional de Oleaginosas. Bahía Blanca. pp. 67-68.
- Beckmann J. S. and Soller M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67:35-43.
- Benchimol L., Lopes de Souza Jr. C. and Pereira de Souza A. 2005. Microsatellite-assisted backcross selection in maize. *Genetics and Molecular Biology.* 28:789-797.
- Bernard R. L. and Cremeens C. R. 1981. An allele at the *rps1* locus from the variety "Kingwa." *Soybean Genet. Newsl.* 8:40-42.
- Bernard R. L., Nelson R. L. and Cremeens C. R. 1991. USDA Soybean Genetics Collection: Isoline Collection. *Soybean Genetics Newsl.* 18:27-57.
- Bertrand S., Olivier C., Marc Mezard M. and Hospital F. 2004. Toward a Theory of Marker-Assisted Gene Pyramiding. *Genetics.* 168:513-523
- Bonde M. R., Nester S. E., Austin C. N., Stone C. L., Frederick R. D., Hartman G. L. and Miles M. R. 2006. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *Phakopsora meibomia* isolates. *Plant Dis.* 90:708-716.
- Bhattacharyya M. K, Gonzales R. A., Kraft M. and Buzzell R. I. 1997. A copia-like retrotransposon Tgmr closely linked to the *Rps1-k* allele that confers race-specific resistance of soybean to *Phytophthora sojae*. *Plant Molecular Biology.* 34:255-264.
- Brim C. A. and Cockerham C. C. 1961. Inheritance of quantitative characters in soybeans. *Crop Science.* 11:564-566.
- Bromfield K. R. and Hartwig E. E. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop. Sci.* 20:254-255.
- Burdon J. J. 1988. Major gene resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in *Glycine canescens*, a wild relative of soybean. *Theor. Appl. Genet.* 75:923-928

- Burdon J. J., Marshall D. R. 1981. Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. *Plant Dis.* 65:44–45.
- Burdon J. J. and Thrall P. H. 2002. Genetic Structure of Natural Plant and Pathogen Populations. *Genetics, Evolution and Biological Control: Papers from IV International Organization for Biological Control Symposium*. Montpellier, France.
- Burr B., Evola S. V., Burr F. A. and Beckmann J. S. 1983. Application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. *Genet. Eng.* 5:45–59.
- Chakraborty N., Curley J., Frederick R. D., Hyten D. L., Nelson R. L., Hartman G. L. and Diers B. W. 2009. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion type resistance to soybean rust. *Crop Science.* 49:783–790.
- Choi I. Y., Hyten D. L., Matukumalli L. K., Song Q., Chaky J. M., Quigley C. V., Chase K., Lark K. G., Reiter, R. S., Yoon M S., Hwang E. Y., Yi S. I., Young N. D., Shoemaker R. C., Van Tassell C. P., Specht J. E. and Cregan P. B. 2007. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. *Genetics.* 176:685–96
- Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B. and Pang E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- Concibido V. C., Diers B. W. and Arelli P. R. 2004. Review and Interpretation. A decade of QTL Mapping for Cyst Nematode Resistance in Soybean. *Crop Sci.* 44:1121–1131.
- Cregan P. B., Jarvik T., Bus A. L., Shoemaker R. C., Lark K. G., Kahler A. L., Kaya N., Van Toai T. T., Lohnes D. G., Chung J. and Specht J.E. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science.* 39:1464–1490.
- De Lucia A., Gilli J., Soldini D., Salines L., Fariza S. and Blaszcchik J. Evaluación de germoplasma de soja frente a la infección por roya asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). 2006. III Congreso de soja del MERCOSUR. Bolsa de cereales. Rosario. Argentina. pp 45.
- De Wit P. J. G. M. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2:452–458.
- Distefano S. de Vallone and Salines L. 2002. Una enfermedad fúngica de la soja siempre vigente y en incremento: la podredumbre de la raíz y base del tallo (*Phytophthora sojae*). Area de Mejoramiento Genético Vegetal EEA INTA Marcos Juárez – Informe técnico Septiembre. 22–25 pp.
- Dorrance A., Berry S. A., Anderson T. R. and Meharg Ch. 2008. Isolation, storage, pathotype characterization, and Evaluation of Resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. Plant Management Network.
- Fehr W. R. 1987. Principles of cultivar development. Macnillan. New York. USA. 525 pp.
- Ferreira M. E. & Grattapaglia D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2º ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. pp. 220.
- Flor H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust-its genetics & other applications. *Phytopathology.* 45:680–685.
- Formento N. y Daverio L. 2001. Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. Campaña agrícola 2000/01. Área de Investigación en Producción Vegetal. INTA-EEA Paraná.
- Förster H., Tyler B. M. and Coffey M. D. 1994. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:780–791.
- Frisch M., Bohn M. and Melchinger A. E. 1999a. Comparison of selection strategies for marker assisted backcrossing of a gene. *Crop Science.* 39:1295–1301.

- Frisch M., Bohn M. and Melchinger A. E. 1999b. 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. and Melchinger A. E. 2000. Plabim: software for simulation of marker-assisted backcrossing. *J Hered.* 91:86–87.
- Gabriel D. W. and Rolfe B. G. 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:365-391.
- Gamundi J. C., Bodrero M. and Lago M. E. 2002. Nematodo del Quiste de la Soja. *IDIA XXI Año II.* 3:83-87.
- Garcia A., Calvo E. S., Kiihl R. S., Harada A., Hiromoto D. M., Vieira L. G. E. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theor. Appl. Genet.* 117:545–553
- Garner W. W. and Allard H. A. 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction of plants. *J. Agric. Res.* 18:553-606.
- Gebhardt J. S., Weisemann J. M., Esau B. D. and Matthews B. F. 1999. Cloning and expression of two soybean genes encoding similar aspartokinase – homoserine dehydrogenase isoforms. *Plant Physiol.* 120:634.
- Ghione C. E. 2011. Evaluación de la diversidad genética entre genotipos de soja mediante la utilización de marcadores moleculares. Tesis Magister. Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 66 pp.
- Gilli J., Sequin L., De Lucia A., Ghione C. and Heinz R. 2009. DNA markers associated with the genetic resistance to asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) present in Argentina. *World Soybean Research Conference VIII.* Beijing, China. pp. 145.
- Giorda L. y Baigorri H. 1997. El cultivo de la soja en Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos. (ed) San Juan, Argentina. 448 pp.
- Grant D., Rex T., Steven N. B., Cannon D. and Shoemaker R. C. 2009. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res.* 38:843-846.
- Guillin 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.
- Guillin E., Gilli J., Buccolini M., Barreto D., Salines L. y Ban T. 2004. Development, validation and use of an *Rps1-k* specific SCAR marker. *VII World Soybean Research Conference. IV International Soybean Processing and Utilization Conference. III Congreso Mundial de Soja, (Brazilian Soybean Congres).* Brazil. pp 105.
- Gutierrez Brower J. 2008. Selección asistida por marcadores moleculares para el mejoramiento genético de la resistencia a factores bióticos que afectan al cultivo de soja en Argentina. Tesis para Licenciatura en Genética. Universidad Nacional de Misiones Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Misiones. Posadas. Argentina. 73 pp.
- Guzman P. S., Diers B. W., St. Martin S. K., Leroy A. R., Grau C. R., Hughes T. J. and Nelson R. L. 2007. QTL for yield in three backcross-derived populations of soybean. *Crop Science.* 47:111-122.
- Hammond-Kosack K. E. and Jones J. D. G. 1996. Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell.* 8:1773–1791.

- Harlan H. V. and Pope M. N. 1922. The use and value of backcrosses in small grain breeding. *J. Heredity*. 13:319-322.
- Hartwig E. E. 1970. Growth and reproductive characteristics of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) grown under short day conditions. *Trop. Sci.* 12:7-53.
- Hartwig E. E. and Bronfield K. R. 1983. Relationship among tree genes conferring specific resistance to rust in soybean. *Crop Science*. 23:237-239.
- Hartwig E. E. 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop. Science*. 26:1135-1136.
- Hospital F. and Charcosset A. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*. 147:1469-1485.
- Hospital F., Chevalet C. and Mulsant P. 1992. Using Markers in Gene Introgression Breeding Programs. *Genetics*. 132:1199-1210.
- Hymowitz T. and Newell C. A. 1981. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Econ. Bot.* 35:272-288.
- Hyten D. L., Hartman G. L., Nelson R. L., Frederick R. D., Concibido V. C., Narvel J. M. and Cregan P. B. 2007. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop Science*. 47:837-840.
- Hyten D. L., Smith J. R., Frederick R. D., Toker M. L., Song Q. and Cregan P. B. 2009. Bulk segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to *Phakopsora pachyrhizi* (soybean rust) in soybean. *Crop Science*. 49:265-271.
- InfoStat. 2004. Infostat/Estudiantil, versión 2.0. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Inouye J., Shanmugasundaram S. and Masuyama F. 1979. Effects of temperature and day length on flowering of some photinsensitive soybean varieties. *Japan J. Tropical Agric.* 22:167-172.
- Ivancovich A., Botta G., Vallone S., Guillin E., Formento N., Guerra G. and Bonocic I. 2004. Soybean rust in Argentina. Abstracts of contributed paper and posters. VII World Soybean Research Conference. IV International Soybean Processing and Utilization Conference. III Congreso Mundial de Soja, (Brazilian Soybean Congress). Brasil. pp 123.
- Ivancovich A., Botta G. and Annone J. 1999. Enfermedades Fúngicas de Soja en Madurez en el Partido de Pergamino (Bs As-Argentina) en el Período 1992-1998. Mercosoja 99. Protección Vegetal – Enfermedades. Rosario, Argentina. pp. 9-12.
- Knapp S. J. 1998. Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. *Crop Science*. 38:1164-1174.
- Lange C. and Whittaker J. 2001. On prediction of genetic values in marker-assisted selection. *Genetics*. 159:1375-1381.
- Li S., Smith J. R., Ray J. D. and Frederick R. D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theor. Appl. Genet.* 125:133-142.
- Lima R. D., Ferraz S. and Santos J. M. 1992. Ocorrência de *Heterodera sp*, em soja no Triângulo Mineiro. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba. 16:101.
- Lordello A. I. L., Lordello R. R. A. & Quaggio, J. A. 1992. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. *Revista de Agricultura*, Piracicaba. 67:223-225.
- Matson A. L. and Williams L. F. 1965. Evidence of a fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode. *Crop Science*. 5:477.

- Matthews B. F., MacDonald M. H., Gebhardt J. S. T. and Devine T. E. 1998 Molecular markers residing close to the *Rhg4* locus conferring resistance to soybean cyst nematode race 3 on linkage group A of soybean. *Theor. Appl. Genet.* 97:1047-1052.
- McDowell J. M. and Simon S. A. 2006. Recent insights into R gene evolution. *Mol Plant Pathol.* 7:437-448.
- McLean R. J. and Bryth D. E. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian J. Agric. Res.* 31:951-956.
- Meksem K., Pantazopoulos P. and Njiti V. N. 1998. "Forrest" resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. *Theor. Appl. Genet.* 103:710-717.
- Meksem K., Ruben E., Hyten D., Triwitayakorn K. and Lightfoot D. A. 2001. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol Genet Genomics.* 265:207-214.
- Meuwissen T., Hayes B. and Goddard M. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics.* 157:1819-1829.
- Monteiro A. R. and Moraes S. R. A. C. 1992. Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines Ichinohe* (1952), prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. *Nematologia Brasileira, Piracicaba.* 6:101.
- Monteros M. J., Missaoui A. M., Phillips D.V., Walker D. R., Boerma H. R. 2007. Mapping and confirmation of the "Hyuuga" RB lesion resistance gene for Asian soybean rust. *Crop Science.* 47:829-834.
- Morel W., Ray J. D., Smith M. R., Miles M. R. and Paniagua S. 2008. Soybean rust, germoplasm evaluation in Paraguay. In: Kudo H, Suenaga K, Soares RM, Toledo A (ed) JIRCAS Working Report No. 58. Tsukuba Japan. JIRCAS. pp. 88-03.
- Murray M. G. and Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
- Myers G. O. and Anand S. C. 1991. Inheritance of resistance and genetic relationships among soybean plant introductions to races of soybean cyst nematode. *Euphytica.* 55:197-201.
- Niblack T. L., Arelli P. R., Noel G. R., Opperman C. H., Orf J. P., Schmitt D. P., Shannon J. G. and Tyka G. L. 2002. A new classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 34:279-288.
- Paterson A. 1996. DNA marker-assisted crop improvement. En Paterson A (ed.) *Genome Mapping in Plants.* Landes Bioscience. Austin, TX, EEUU. pp. 72-83.
- Ploper L. D. 1999. Management of Economically important Diseases of Soybean in Argentina. *Proceedings of World Soybean Research Conference VI.* Illinois, USA. pp. 269-280.
- Polzin K. M., Lorenzen L. L., Olson T. C. and Shoemaker R. C. 1994. An unusual polymorphic locus useful for tagging *Rps1* resistance alleles in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 89:226-232.
- Poonpolgul S. 1997. Physiological races of soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi* and inheritance of resistance in soybean. Ph. D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Ray J. D., Morel W., Smith J. R., Frederick R. D and Miles M. R. 2009. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. *Theor. Appl. Genet.* 119:271-280.
- 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*. 40:91-98.
- Ribaut J. M., Jiang C. and Hoisington D. 2002. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. *Crop Science*. 42:557-565
- Ribaut J. M. and Betran J. 1999. Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Mol. Breed.* 5:531-541.
- Ribaut J. M. and Hoisington D. 1998. Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3: 236-239.
- Riggs R. D. and Schmitt D. P. 1988. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 20:392-395.
- Riggs R. D. and Schmitt D. P. 1991. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. *J. Nematol.* 23:149-154.
- Robertson A. 2004. *Phytophthora Root and Stem Rot of Soybean*. Iowa university extension. Pest Management. pp 2-5.
- Rossi, R. L. 2003. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. *Plant Dis.* 87:102.
- Santos D. J., Ferrari B., Fresoli D., Beret P., Benavides R., Vicentini R., Della Magdalena M., Moundino M., Salas G., Lustig S., Antongiovani M., Devani M., Ledesma F., Lizondo M., Erazzu L., Salines L., Baigorri H., Nari C., Rossi R., Salado Navarro L., Dolinkue R., Wright R., Curti L., Sanmartin O. and De la Vega A. J. 2006. Ganancia genética de la soja en Argentina entre 1980 y 2000. 3° Congreso de Soja del MERCOSUR. Rosario, Argentina. pp 196-200.
- SAS Intitute. 1989. SAS/SAT Use'rs Guide, version 6, v 2, SAS Institute, Cary, 846 pp.
- Schmitthenner A. F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora root rot* of soybean. *Plant Dis.* 69:362-368.
- Schmitthenner A. F. 1999. *Phytophthora root rot*. En: G. L. Hartman, J. B. Sinclair, and J. C. Rupe (ed) *Compendium of Soybean Diseases*. 4th ed. APS Press. Am. Phytopath. Soc., St. Paul, MN. pp. 39-42.
- Schmutz J., Cannon S. B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D. L., Song Q., Thelen J. J., and Cheng J. 2010. Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183.
- Skorupska H. T, Choi I. S., Rao Arelli A. P. and Bridges W. C. 1994. Resistance to soybean cyst nematode and molecular polymorphism in various sources of Peking soybean. *Euphytica*. 75:63-70.
- Sleper D. A. and Shannon J. G. 2003. Role of public and private soybean breeding programs in the development of soybean varieties using biotechnology. *AgBioForum*, 6(1&2). pp. 27-32.
- Song Q. J., Marek L.F., Shoemaker R.C., Lark K. G., Concibido V. C., Delannay X., Specht J. E. and Cregan P. B. 2004. A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor. Appl. Genet.* 109:122-128.
- Specht J. E. and Williams J. H. 1984. Contribution of genetic technology to soybean productivity-retrospect and prospect.: Genetic contributions to yields gains of major plants. Fehr W. R. (ed) *Crop Science Society of America and American Society of Agronomy*. Madison. Wisconsin. EE.UU. pp 49-74.
- Stam P. and Zeven C. 1981. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*. 30:227-238.
- Stuber C. W. 1999. Enhancement of grain yield in maize using marker-facilitated introgression of QTLs. *Proceedings of the Symposium "Analysis of Molecular Marker*

- Data”, Joint Plant Breeding Symposia Series, American Society for Horticultural Science/Crop Science of America, Corvallis, Oregon. pp. 44-46.
- Tanksley S., Young N., Paterson A. and Bonierbale M. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology*. 7:257-263.
- Tanksley S. D. and Nelson J. C. 1996. Advanced backcross QTL analysis: A method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92:191-203.
- Tanksley S. D. and Rick C. M. 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57:161-170.
- Van Berloo R. 2008. Computer note: GGT 2.0: versatile software for visualization and analysis of genetic data. *J Hered* 99. 2:232-236.
- Vallone S. and Giorda L. 1997. Enfermedades. En: Giorda, L. y H. Baigorri (ed). *El Cultivo de la Soja en Argentina*. INTA. Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez- EEA Manfredi. Coordinación Subprograma de Soja. pp. 214-244.
- Vallone S. 2002. Enfermedades de la Soja. *IDIA XXI Año II*. 3:68-74.
- Visscher P. M. 1996. Proportion of the variation in genomic composition in backcrossing programs explained by molecular markers. *J. Hered.* 87:136-138
- Ward E. W. B. 1990. The interaction of soya beans with *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea: Pathogenicity. En: *Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. D. Hornby (ed). CAB Int., Wallingford, UK. pp 311-327.
- Webb D. M, Baltazar B. M, Rao-Arelli A. P, Schupp J., Clayton K., Keim P. and Beavis W. D 1995. Genetic mapping of soybean cyst nematode race 3 resistance loci in the soybean PI 437.654. *Theor. Appl. Genet.* 91:574-581.
- Weisemann J. M, Matthews B. F, Devine T. E. 1992. A tight genetic linkage of the genes controlling seed coat color (*I*), soybean cyst nematode resistance (*Rhg4*), the 34-kDa oil body protein and aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Theor. Appl. Genet.* 85:136-138.
- Yamanaka N., Silva D. C. G., Passianotto A. L. L., Nogueira L. M., Polizel A. M., Pereira S. S., Santos J. V. M., Brogin R. L., Arias C. A. A., Hoffmann-Campo C. B., Nepomuceno A. L. and Abdelnoor R. V. 2008. Identification of DNA markers and characterization of the genes for resistance against Asian soybean rust. In: Kudo H, Suenaga K, Soares RM, Toledo A (ed) *JIRCAS Working Report No. 58*. Tsukuba Japan. JIRCAS. pp. 99-107.
- Yorinori J. T., Paiva W. M., Frederick R. D., Costamilan L. M., Bertagnolli P. F. and Hartman G. L. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Dis.* 89:675-677.
- Young N. and Tanksley S. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77:353-359.
- Zeven A. C., Knott D. R. and Johnson R. 1983. Investigation of linkage drag in near isogenic lines of wheat by testing for seedling reaction to races of stem rust, leaf rust and yellow rust. *Euphytica*. 32:319-32.

ANEXO 1

COMPARACIONES MÚLTIPLES (LSD - FISHER)

Tabla 1. Comparaciones múltiples (LSD - Fisher) entre grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en todas las fechas de siembra (FS).

GM	FS	Estimado	Error	Grupo
VII	8/9	107.83	1.6946	a
VI	8/9	98.6667	1.6946	b
V	8/9	97.5556	1.3836	b
IV	8/9	77.4167	1.1982	c
III	8/9	74.6667	1.6946	c
II	8/9	72.3333	2.3965	c
GM	9/10	91.8333	1.6946	a
VII	9/10	85.6667	1.6946	b
VI	9/10	83.2222	1.3836	b
V	9/10	50.3333	2.3965	c
IV	9/10	48.9167	1.1982	c
III	9/10	42.3333	1.6946	d
VII	14/11	54.8333	1.6946	a
VI	14/11	72.8333	1.6946	b
V	14/11	70.2222	1.3836	b
IV	14/11	43.4167	1.1982	c
III	14/11	40.1667	1.6946	cd
II	14/11	37.3333	2.3965	d
VII	12/12	61.166	1.694	a
VI	12/12	58.333	1.694	ab
V	12/12	56.333	1.383	b
IV	12/12	43.500	1.198	c
III	12/12	39.833	1.694	c
II	12/12	39.667	2.396	c

Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$

Tabla 1. Comparaciones múltiples (LSD - Fisher) entre grupos de madurez (GM) para días a R1 (D/R1) en todas las fechas de siembra (FS) (continuación).

GM	FS	Estimado	Error	Grupo
VII	2/1	55.500	1.694	a
VI	2/1	51.500	1.694	ab
V	2/1	49.333	1.383	b
IV	2/1	36.083	1.198	c
III	2/1	35.000	1.694	c
II	2/1	34.000	2.396	c
VII	17/1	54.8333	1.6946	a
VI	17/1	52.8333	1.6946	a
V	17/1	43.4444	1.3836	b
IV	17/1	32.9167	1.1982	c
III	17/1	30.0000	2.3965	c
II	17/1	30.0000	1.6946	c

Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$

ANEXO 2

COMPOSICIÓN ALELICA DE PLANTAS SELECCIONADAS EN LAS DISTINTAS GENERACIONES DE RC Y RC_{3F2}

Tabla 1. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a *Rhg4*.

MM	P (cM)	RC ₁							RC ₂							RC ₃		
		pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl7	pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl7	pl1	pl2	pl3
Satt632	51.50	B	H	B	B	H	H	B	B	H	B	B	H	H	B	H	H	H
Sat_162	51.86	H	H	B	B	H	H	B	H	H	B	B	H	H	B	H	H	H
AK-HSDH	52.90	H	H	B	B	H	H	B	H	H	B	B	B	H	B	H	H	H
STS-A2D8	53.90	H	H	B	B	H	H	B	H	H	B	B	B	H	B	H	H	H
Sat_212	56.32	H	H	B	B	B	H	B	H	B	B	B	B	H	B	B	B	H

MM: marcador molecular; P (cM): posición en el mapa genético medido en centimorgan; pl: planta caracterizada; B: estado homocigota; H: estado

Tabla 2. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a *Rps1-k*.

MM	P (cM)	RC ₁						RC ₂					RC ₃			
		pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	H	B	B	H
Satt159	27.13	H	H	B	B	H	H	B	B	H	B	B	H	B	H	H
Satt009	28.00	H	H	B	H	H	B	B	B	H	H	B	H	B	H	H
SCAR-tgmr	28.52	H	H	B	H	H	B	B	B	H	H	B	H	B	H	H
Satt641	29.28	H	H	H	H	H	B	B	B	H	H	B	H	B	B	H

MM: marcador molecular; P (cM): posición en el mapa genético medido en centimorgan; pl: planta caracterizada; B: estado homocigota; H: estado Heterocigota.

Tabla 3. Composición alélica de plantas seleccionadas en cada ciclo de RC para la región genómica asociada a *Rpp4*.

MM	P (cM)	RC ₁						RC ₂							RC ₃			
		pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl7	pl1	pl2	pl3	pl4
Satt505	63.00	B	H	B	H	H	B	B	H	H	B	B	B	H	B	H	H	H
Satt288	76.77	B	H	B	B	H	H	H	B	H	B	B	B	H	H	H	H	B
Satt191	96.57	B	B	B	B	H	H	H	B	H	B	B	B	H	B	B	H	B

MM: marcador molecular; P (cM): posición en el mapa genético medido en centimorgan; pl: planta caracterizada; B: estado homocigota; H: estado Heterocigota.

Tabla 4. Composición alélica de la plantas RC_{3F2} caracterizadas para cada región genómica de interés.

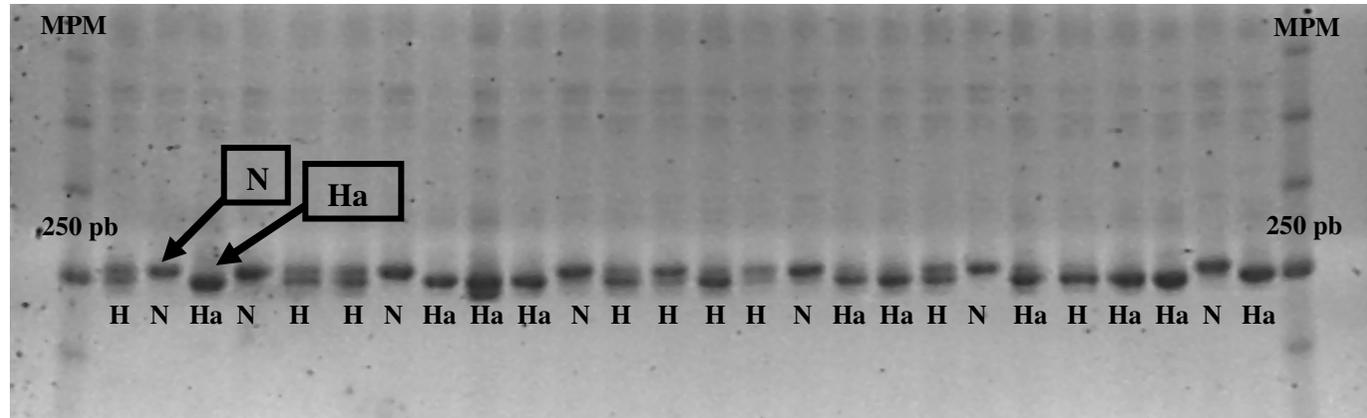
Gen	MM	P (cM)	Plantas RC _{3F2}														
			pl1	pl2	pl3	pl4	pl5	pl6	pl7	pl8	pl9	pl10	pl11	pl12	pl13	pl14	pl15
<i>Rhg4</i>	Satt632	51.50	H	H	B	B	H	H	A	A	B	H	A	H	H	A	H
	AK-HSDH	52.90	H	H	B	B	H	H	A	A	H	H	A	H	H	H	H
	STS-A2D8	53.90	H	H	B	B	H	H	A	A	H	H	A	H	H	H	H
	Satt424	56.32	B	H	B	B	H	B	B	A	H	H	A	A	A	A	H
<i>Rps1-k</i>	Satt159	27.13	H	H	A	H	B	H	H	A	H	H	B	B	B	H	A
	Satt009	28.00	A	H	A	H	B	H	H	A	H	H	B	B	B	H	A
	SCAR-tgmr	28.52	A	H	A	H	B	H	H	A	H	H	B	B	B	H	A
	Satt641	29.28	A	H	A	H	B	H	H	A	B	B	B	B	B	B	A
<i>Rpp4</i>	Satt505	63.00	A	A	B	A	H	B	A	H	H	A	H	B	H	H	H
	Satt288	76.77	A	A	B	A	A	B	A	H	H	A	H	B	H	H	H
	Satt191	96.57	A	A	H	A	A	H	H	H	H	A	H	B	H	H	B

MM: marcador molecular; P (cM): posición en el mapa genético medido en centimorgan; A: estado homocigota para el parental donante; B: estado homocigota para el parental recurrente; H: estado Heterocigota.

ANEXO 3

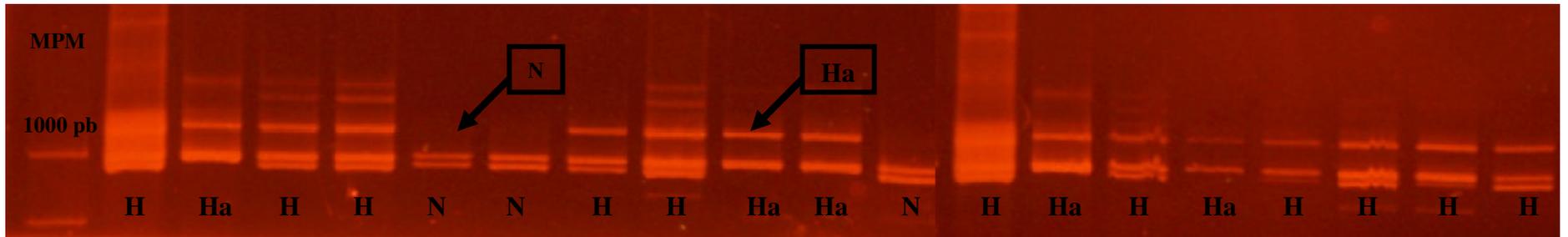
GELES DE ELECTROFORESIS PARA LOS MARCADORES MOLECULARES USADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS RC_{3F2}

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt632 en plantas RC_{3F2}.



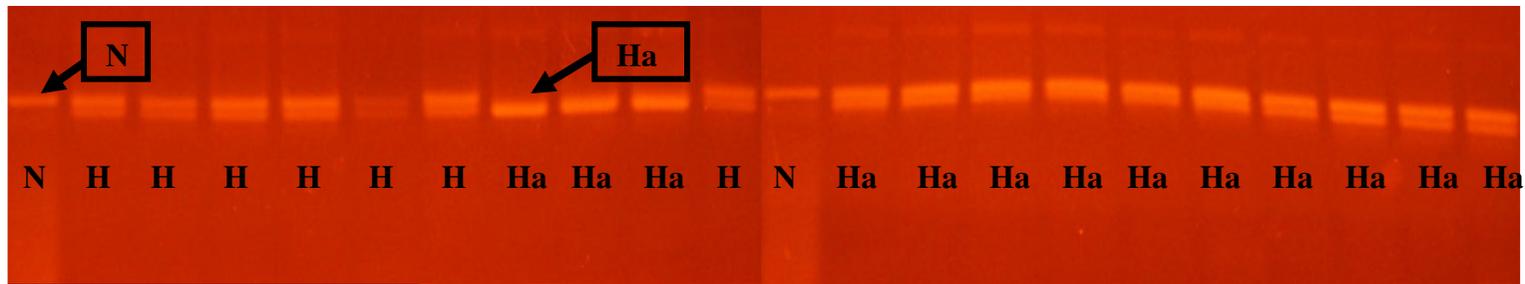
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; Ha: alelo de Hartwig.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa MetaPhor al 3 % para AK-HSDS_{548/563} en plantas RC_{3F2}.



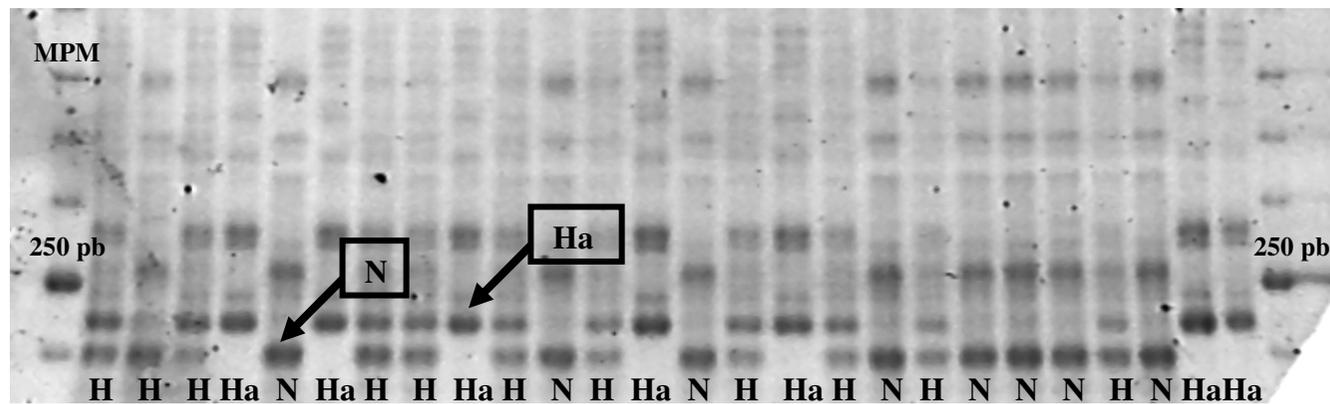
H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; Ha: alelo de Hartwig.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa MetaPhor al 3 % para STS-A2D8 en plantas RC_{3F2}.



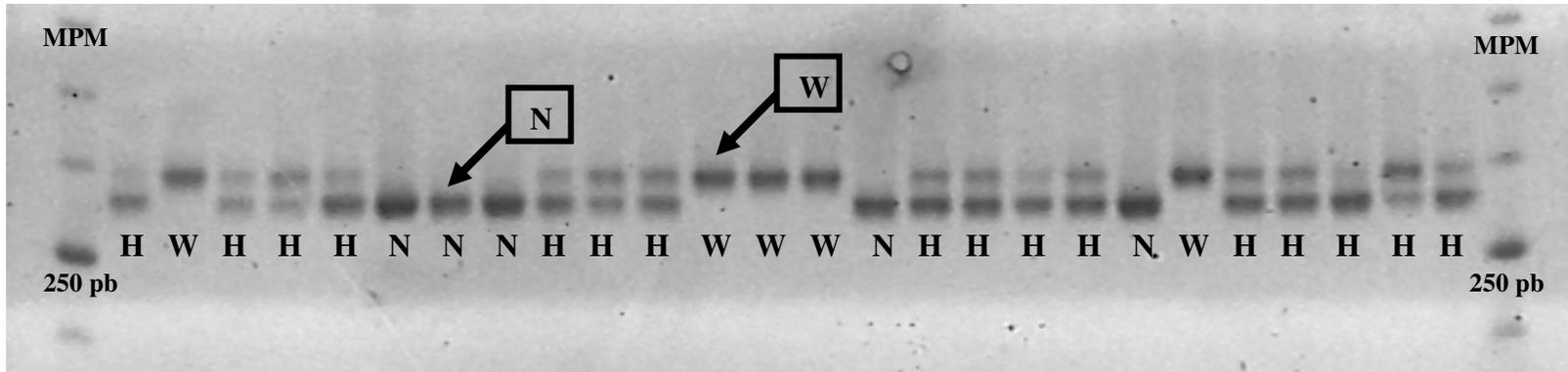
H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; Ha: alelo de Hartwig.

Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt424 en plantas RC_{3F2}.



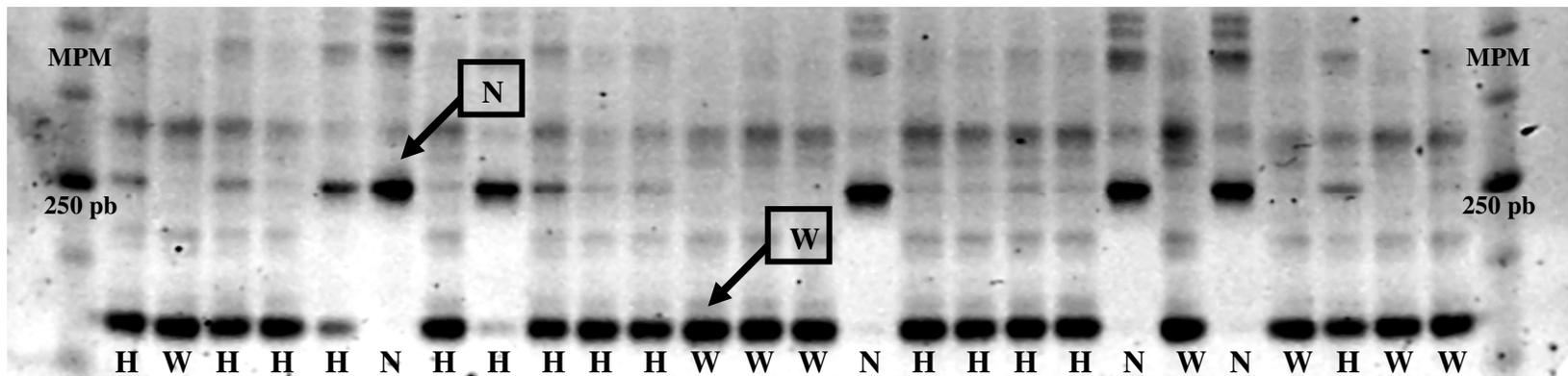
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; Ha: alelo de Hartwig.

Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt159 en plantas RC₃F₂.



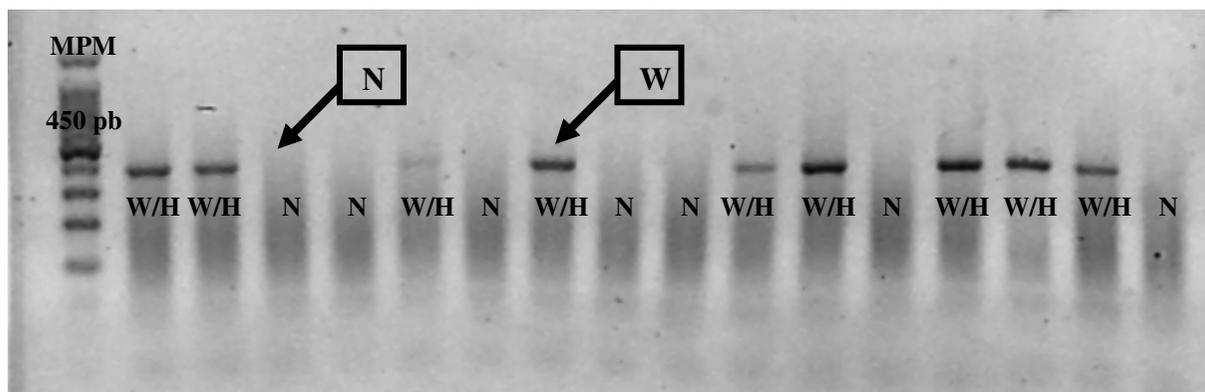
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; W: alelo de Williams 82.

Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt009 en plantas RC₃F₂.



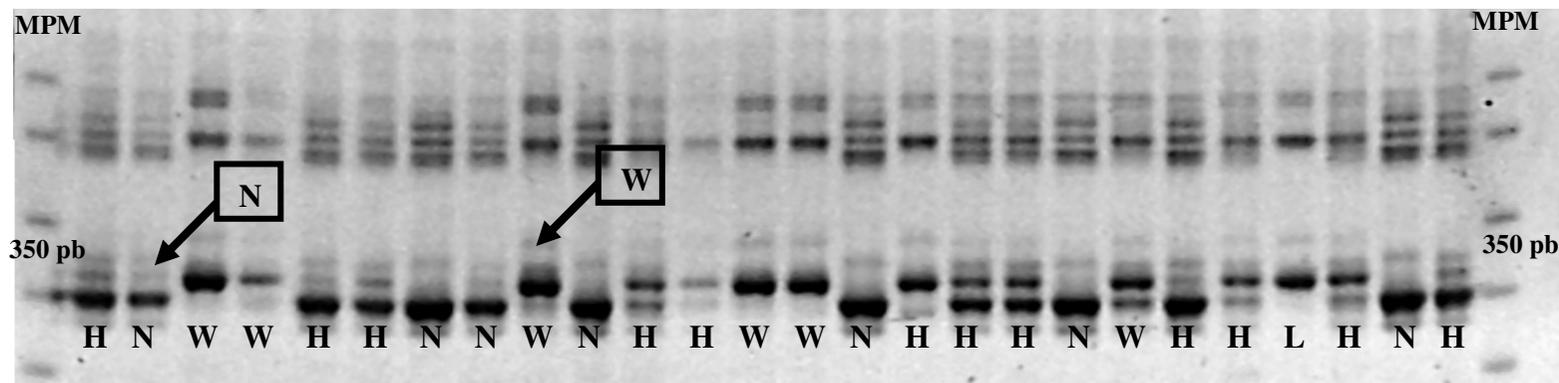
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; W: alelo de Williams 82.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % para SACAR-tgmr en plantas RC_{3F2}.



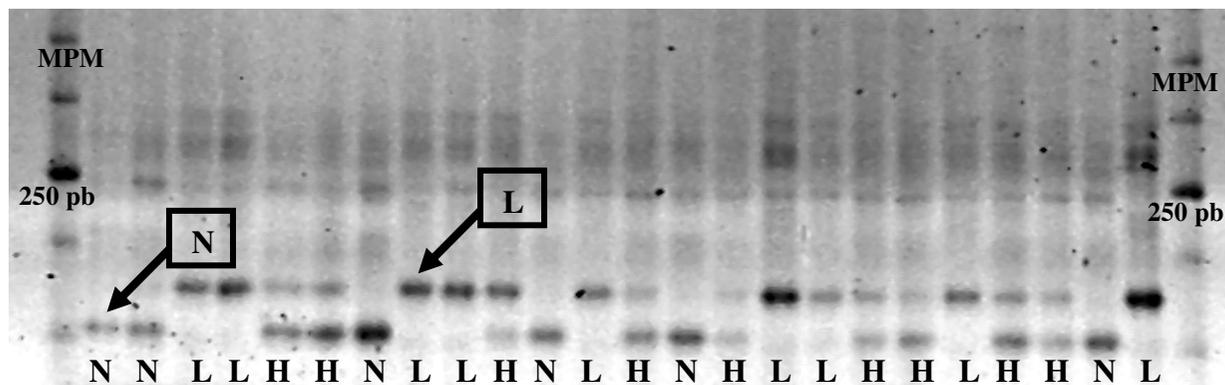
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; W/H: alelo de Williams 82/estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107.

Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt641 en plantas RC_{3F2}.



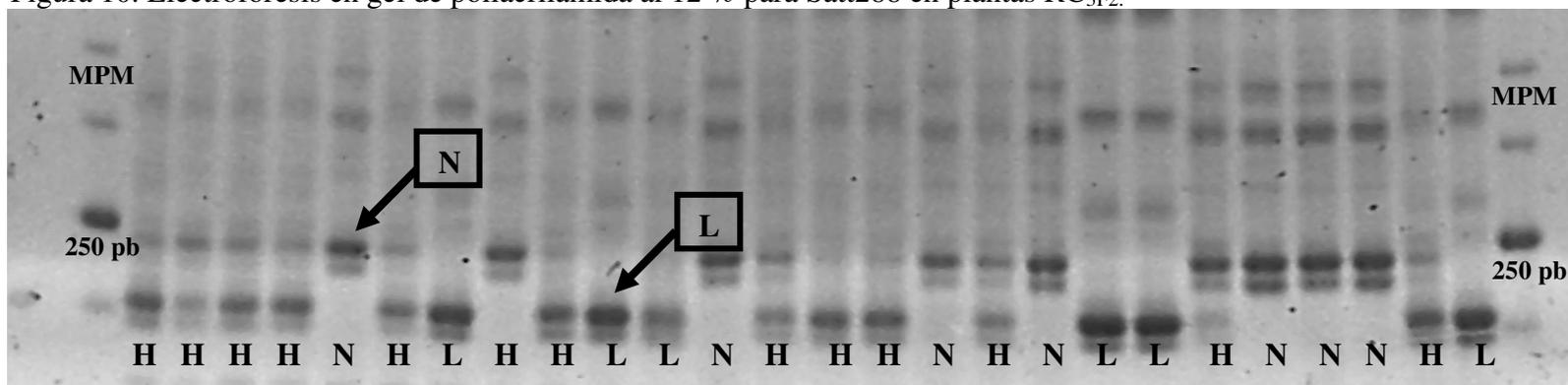
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; W: alelo de Williams 82.

Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt505 en plantas RC_{3F2}.



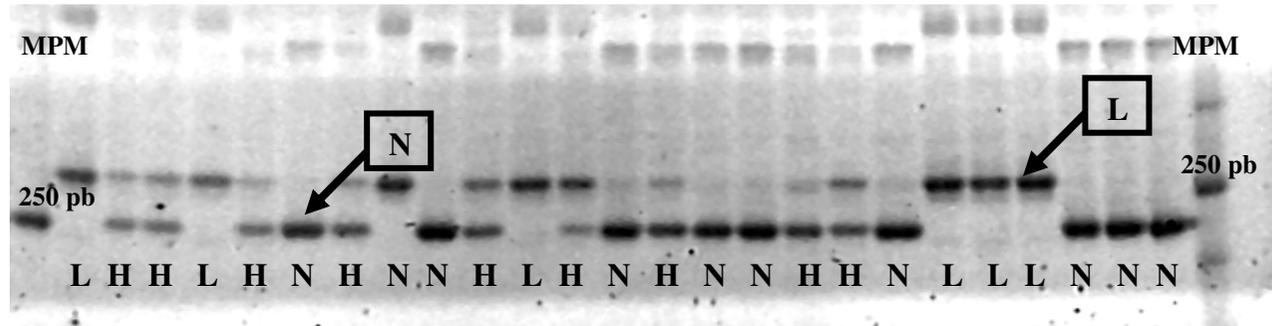
MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; L: alelo de L87-0482.

Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt288 en plantas RC_{3F2}.



MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; L: alelo de L87-0482.

Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para Satt191 en plantas RC_{3F2}.



MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; H: estado heterocigota; N: alelo de NEM 3107; L: alelo de L87-0482.

ANEXO 4

VALORES OBTENIDOS PARA LOS CARACTERES DE ADAPTACIÓN EVALUADOS EN EXPERIMENTO A CAMPO

Tabla 1. Valores obtenidos de las progenies derivadas de plantas RC_{3F2} para caracteres de adaptación.

Genotipo	R	D/R1	A/R1	D/R5	A/R5	D/R8	A/R8	VCO/R8	HC
GL A2(pl11)	1	52	50	60	70	118	70	3	1
GL A2(pl11)	2	51	60	58	90	118	90	2	
GL A2(pl11)	3	52	55	58	90	120	90	1	
GL A2(pl1)	1	51	60	60	70	130	100	0	2
GL A2(pl1)	2	51	50	55	60	115	60	0	
GL A2(pl1)	3	50	50	58	55	113	60	0	
GL A2(pl2)	1	52	65	58	90	130	105	2	1
GL A2(pl2)	2	56	65	63	80	132	100	2	
GL A2(pl2)	3	58	60	65	90	140	90	3	
GL G(pl1)	1	58	60	64	90	134	90	2	3
GL G(pl1)	2	58	50	63	90	132	90	1	
GL G(pl1)	3	58	45	63	80	133	80	2	
GL A2(pl15)	1	53	55	63	100	118	100	1	3
GL A2(pl15)	2	53	60	63	80	118	80	2	
GL A2(pl15)	3	55	60	58	80	118	80	2	
GL N(pl8)	1	51	60	60	80	118	70	0	3
GL N(pl8)	2	52	60	60	70	113	70	0	
GL N(pl8)	3	52	60	55	80	118	80	1	
GL A2(pl4)	1	51	65	65	80	127	110	3	2
GL A2(pl4)	2	50	70	55	100	118	100	3	
GL A2(pl4)	3	51	50	55	90	120	90	1	
GL G(pl4)	1	57	50	58	80	133	90	1	3
GL G(pl4)	2	57	50	68	90	135	100	1	
GL G(pl4)	3	58	50	65	90	135	110	1	
GL N(pl7)	1	58	60	70	100	132	100	1	3
GL G(pl7)	2	58	60	70	100	128	90	0	
GL G(pl7)	3	59	45	70	80	128	100	2	
GL N(pl4)	1			70	80	122	70	0	1
GL N(pl4)	2	58	55	70	100	135	110	1	
GL N(pl4)	3			70	75	132	85	1	
GL G(pl5)	1	57	65	62	90	130	105	0	2
GL G(pl5)	2	59	50	68	80	135	90	1	
GL G(pl5)	3	59	50	65	90	118	70	0	
GL N(pl2)	1	59	45	65	90	135	100	1	3
GL N(pl2)	2	59	40	63	80	133	90	0	
GL N(pl2)	3	56	55	65	90	140	90	0	
GL A2(pl8)	1	59	50	62	80	133	80	1	2
GL A2(pl8)	2	58	50	68	90	133	100	1	
GL A2(pl8)	3	57	40	68	75	130	85	1	
GL N(pl3)	1	58	45	63	90	130	95	1	3
GL N(pl3)	2	57	55	65	90	132	100	1	
GL N(pl3)	3	59	55	65	90	133	105	0	
GL N(pl7)	1	40	25	55	50	116	50	1	2
GL N(pl7)	2	38	20	58	70	118	70	1	
GL N(pl7)	3	42	35	55	60	132	110	0	
GL N(pl10)	1	50	55	65	90	135	90	3	3

R: repetición; D/R1: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R1; A/R1: altura en cm de plantas en R1; D/R5: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R5; A/R5: altura en cm de plantas en R5; D/R8: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R8; A/R8: altura en cm de plantas en R8; VCO/R8: vuelco de plantas en R8 (0 = ausencia de vuelco, 3 = máximo vuelco); HC: Hábito de crecimiento (1 = determinado, 3 =

Tabla 1. Valores obtenidos de progenies derivadas de plantas RC_{3F2} para caracteres de adaptación (continuación).

Genotipo		D/R1	A/R1	D/R5	A/R5	D/R8	A/R8	VCO/R8	HC
GL N(pl10)	2	50	50	65	80	118	80	2	
GL N(pl10)	3	50	50	60	85	130	80	0	
GL G(pl12)	1	59	45	63	80	133	80	3	2
GL G(pl12)	2	57	60	70	90	130	100	2	
GL G(pl12)	3	59	40	65	70	135	100	1	
GL N(pl13)	1	42	25	60	80	110	80	1	3
GL N(pl13)	2			60	70	127	85	1	
GL N(pl13)	3	42	30	65	80	123	90	1	
GL N(pl15)	1	41	25	63	70	120	90	0	2
GL N(pl15)	2	42	25	58	70	118	70	0	
GL N(pl15)	3	42	25	58	70	118	70	1	
GL G(pl14)	1	56	45	68	90	132	100	1	3
GL G(pl14)	2	59	45	63	80	130	90	1	
GL G(pl14)	3	57	50	63	70	130	90	2	
GL G(pl15)	1	57	40	63	80	129	80	2	2
GL G(pl15)	2	56	55	65	90	135	100	1	
GL G(pl15)	3	55	45	60	90	120	90	0	
Hartwig	1	59	65	70	90	140	90	4	1
Hartwig	2	56	50	73	90	135	100	5	
Hartwig	3	56	55	73	90	130	90	5	
L87-0482	1	41	30	60	90	113	90	2	2
L87-0482	2	44	30	60	90	113	90	1	
L87-0482	3	41	35	55	90	113	90	2	
NEM 3107	1	57	55	63	90	135	100	1	3
NEM 3107	2	57	55	63	90	132	100	1	
NEM 3107	3	57	60	63	90	127	100	1	
GL G(pl19)	1	43	20	60	75	125	80	1	1
GL G(pl19)	2	42	30	65	90	120	90	0	
GL G(pl19)	3	42	35	63	80	133	110	0	
GL N(pl11)	1	42	35	60	80	127	100	1	1
GL N(pl11)	2	41	35	63	100	129	110	1	
GL N(pl11)	3	42	30	60	90	115	90	1	
GL G(pl10)	1	57	50	70	100	138	110	1	3
GL G(pl10)	2	59	60	63	100	135	110	1	
GL G(pl10)	3	58	50	68	90	130	100	0	
GL A2(pl17)	1	59	50	63	80	135	90	1	3
GL A2(pl17)	2	58	55	65	100	133	110	1	
GL A2(pl17)	3	59	50	70	100	133	100	0	
GL G(pl13)	1	57	50	63	90	130	95	1	1
GL G(pl13)	2	58	55	65	90	130	90	1	
GL G(pl13)	3	58	65	68	90	130	100	0	
Williams 82	1	40	45	60	100	113	110	0	2
Williams 82	2	38	65	60	100	113	110	0	
Williams 82	3	41	35	60	100	113	80	1	

R: repetición; D/R1: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R1; A/R1: altura en cm de plantas en R1; D/R5: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R5; A/R5: altura en cm de plantas en R5; D/R8: cantidad de días desde la siembra al estadio reproductivo R8; A/R8: altura en cm de plantas en R8; VCO/R8: vuelco de plantas en R8 (0 = ausencia de vuelco, 3 = máximo vuelco); HC: Hábito de crecimiento (1 = determinado, 3 = indeterminado).