

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA PARA GRADUADOS



*Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Agropecuarias:*

**Prospección de atributos genéticos en una población RILs  
del género *Arachis* para desarrollar un sistema de  
marcadores moleculares como herramienta para selección  
asistida en la obtención de cultivares de maní**

Doctorando

**Ing. Agr. Francisco Javier de Blas**

**Córdoba, 2021**

## **Comisión Asesora de Tesis**

Director: Dr. José Guillermo Seijo

Codirector: Dr. Nelson Rubén Grosso

Asesora: Dra. María Marcela Manifesto

## **Tribunal Examinador de Tesis**

Dra. Eliana López Colomba

Dra. María Marcela Manifesto

Dra. Natalia Cecilia Bonamico

## **Presentación formal académica**

25 de marzo de 2021

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



I M B I V

Esta tesis fue realizada gracias a una beca del Consejo Nacional de Investigaciones en Ciencia y Tecnología, radicada entre los años de 2016 y el presente en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal de la Universidad Nacional de Córdoba

## **Agradecimientos**

Ana y Marcelo, gracias por ser los promotores iniciales de mis sueños, gracias a ellos por confiar y creer en mí y en mis expectativas.

A la Universidad Nacional de Córdoba y los profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, gracias por el tiempo dedicado y la vocación puesta al servicio de la educación pública.

A la Mgter. Laura I. Torres y al Dr. Mario I. Buteler, gracias por confiar en mí para llevar adelante este proyecto, por su guía y por instarme siempre al pensamiento crítico.

Al IMBIV-CONICET-UNC y al Consejo Nacional de Investigaciones en Ciencia y Tecnología por otorgarme 5 años de beca doctoral para realizar este trabajo de tesis y a la Fundación Maní Argentino, por los recursos económicos al inicio de este proyecto.

Al Dr. Guillermo Seijo, quiero agradecerle primero por la dirección de mi beca doctoral CONICET por la guía y el acompañamiento durante todo el proceso de realización de la tesis, por las muchas horas dedicadas a mi formación, por alimentar siempre la búsqueda del conocimiento riguroso y por su calidez humana para mostrar el camino de la concordia y el respeto en cada situación. También quiero agradecer a la Dra. Viviana Solís Neffa, Nazarena y Jerónimo por hacerme sentir como en casa cada vez que visité la hermosa Corrientes para capacitarme e intercambiar experiencias con los becarios/as e investigadores del IBONE-CONICET-UNNE.

Al Dr. Rubén Grosso, gracias por la co-dirección de mi beca doctoral y por poner a disposición el equipamiento e insumos del laboratorio de química biológica de la FCA-UNC.

A la Dra. Marcela Manifesto, gracias por sus aportes y colaboración en la ejecución de esta tesis.

Al Ing. Agr. Juan Soave, la Ing. Agr. Sara Soave, Clelia, María y a todo el personal del Criadero El Carmen, por los recursos económicos, la generosidad, el tiempo y la calidez humana, que constituyeron un ámbito de trabajo comfortable durante estos años de estudio. Especialmente quiero agradecer a la Ing. Agr. Melina Rosso, Gabriela, Romina, Vanesa y Clarisa, quienes fueron actrices fundamentales en el mantenimiento y seguimiento de los ensayos de campo para esta tesis.

A Olegario Royo, por su generosidad al instruirme en la metodología de morfometría.

A Mariana y Luciana, por la paciencia y ayuda durante el trabajo en el laboratorio de química biológica y de lactología de la FCA-UNC.

A mi hermana Josefina, por su ayuda incondicional, siempre. Y a Juan, Rocío, Alejandra y Agustín y Micaela, por el aliento que me dieron.

A mis compañeros/as de laboratorio, Cristina, Fernando, Melani, María, Marina Natalia y Pablo, porque fueron mis interlocutores y apoyo incontadas veces en todo este proceso. Especialmente quiero agradecerle a la Mgter. Beatriz Costero por su incondicional colaboración en las tareas de laboratorio, curación de datos y escucha amistosa y a la Dra. Paula Bima, gracias por su desinteresada presencia, confianza y predisposición.

A los profesores de la Cátedra de Genética de la FCA-UNC, Adriana, Guadalupe, Lorena, Ricardo, Paula y Walter por su apoyo y comprensión.

A la Dra. Renee Arias y a la Dra. Alicia Masa, por su confianza y dedicación durante mi estadía en el NPRL-USDA-ARS y durante la escritura de artículos científicos en conjunto.

A la Dra. Paola Faustinelli y a su familia, por la calidez y hospitalidad durante mi estancia en Dawson, Gerogia, EE.UU.

A Genara, Rodolfo, Genara, María y Raquel, gracias por permitirme atravesar este proceso acompañado y alentado por sus preguntas y apoyo.

A Victor Mochkofsky, por su colaboración y guía en la preparación de la presentación de la defensa de tesis.

A mis amigos y amigas, Carla, Vicky, Pablo, Sole, Ariel y Nacho, gracias por empatizar siempre y escucharme. A Silvana Montechiessi, especialmente gracias por poner en este trabajo académico la belleza de su arte que es la ilustración del ejemplar de *A. hypogaea* al pie de la dedicatoria.

Y a Federico, mi compañero de vida. Te agradezco por tu preocupación y tantos aportes, por comprender desde tu experiencia personal el proceso que atravecé, por cuidar el entorno de nuestra casa en el que trabajé muchas horas y por acompañarme con el esfuerzo diario de tu trabajo.

A los pueblos originarios de Latinoamérica que conservan en sus huertos, la diversidad de *Arachis hypogaea*.

A Claudia, porque me ayudaste hasta el final.



## Resumen

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo industrial importante en Argentina. El cambio climático global y los requerimientos humanos de alimentación evidencian la necesidad de contar con materiales genéticamente diversos para la mejora adaptativa y productiva del maní cultivado. La diversidad encontrada en el germoplasma secundario del género *Arachis* ofrece recursos para seleccionar materiales con variabilidad morfológica, nutritiva y de resistencia a enfermedades como el “carbón del maní”. Esta enfermedad causada por *Thecaphora frezii*, es un problema para el sector productivo y una amenaza latente para la producción mundial de maní. Este trabajo tiene como objetivos, identificar QTLs de resistencia al carbón del maní mediante el uso de SNPs, en un contexto genético tetraploide. Caracterizar la variabilidad morfológica, composición química proximal y ácidos grasos de una población de RILs del género *Arachis*. La que estuvo compuesta de 103 líneas derivadas del cruzamiento entre [*A. hypogaea* (susceptible) × anfidiplóide artificial (resistente)]. Estas fueron caracterizadas genotípicamente con SNPs mediante la plataforma 48K Axiom *Arachis2* y se evaluó la variabilidad fenotípica de los caracteres mencionados. La variabilidad macromorfológica fue elevada y se detectaron correlaciones entre caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos con la resistencia al carbón del maní. Las variables químicas proximales mostraron variación, al igual que en el contenido de ácidos grasos y se concluyó que las especies silvestres no habrían introgresado segmentos genómicos indeseables para la estabilidad oxidativa de los aceites. El análisis del contenido de ácido oléico, confirmó que la herencia del carácter se ajusta al modelo de dos *loci* dialélicos con dominancia completa y con interacción epistática doble dominante. Por otro lado, el anfidiplóide y 29 RILs fueron resistentes al carbón con una incidencia < 11%. Se construyó un mapa genético con 1819 SNPs en 21 grupos de ligamiento. Se identificaron dos QTLs, *qSmIA08* y *qSmIA02/B02*, en los cromosomas A08 y A02/B02, que explicaron el 17,52% y el 9,06% de la varianza fenotípica, respectivamente. El efecto combinado de ambos redujo el 57% de la incidencia de carbón. Dentro de los QTLs se identificaron 44 modelos de genes de resistencia. El estudio de esta población de RILs, constituye un avance significativo para el desarrollo de nuevos cultivares de maní con diferentes fuentes de resistencia. El QTL mayor y menor identificados en este estudio proporcionan nueva información de la arquitectura genética de la resistencia al carbón del maní que podrían ser utilizados en programas de mejoramiento para obtener nuevas variedades resistentes al carbón del maní. Las mismas permitirían recuperar el potencial productivo del sector manisero que, traducido en divisas, alcanzaría US\$ 150 millones.

**Palabras claves:** *Arachis* - Carbón del maní - variabilidad genética - resistencia - QTLs

## Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an important crop in Argentina. Climate change and good quality food for people imposes a great challenge for crops. It turns out with the necessity of genetic diversity in vegetal materials for breeding and improvement of adaptive and productive traits of the cultigen. Though the genetic diversity found in the secondary genetic pool of *Arachis* genus, provides a source to select materials with morphologic, nutritional quality variability and resistance to diseases as peanut smut. This disease, caused by *Thecaphora frezii* is an issue for farmers and the peanut industry in Argentina. Even though it is a local problem, may soon become a global peanut community threat. This study is aimed to identify QTLs for peanut smut resistance using SNPs within a tetraploid genetic background. To characterize morphologic, proximal chemical composition and fatty acids in a 103 of RILs population which was obtained by crossing [*A. hypogaea* (susceptible) × synthetic amphidiploid (resistant)]. These were genotyped using the 48k, Axiom *Arachis2* and the phenotypic variability was evaluated. The morphologic variability was high and correlations were found between vegetative and reproductive morphologic traits and peanut smut resistance. The proximal chemical variables showed a broad range of variability as in the fatty acid content and wild progenitors would not have introgressed undesirable traits for oils oxidative stability. The oleic acid analysis confirmed that the inheritance of the trait fits under the model of two complete dominance bi-allelic *loci* and double dominant epistatic interaction. The amphidiploid and 29 RILs were resistant to peanut smut (incidence < 11%). A genetic map with 1819 SNPs arranged into 21 linkage groups was constructed. Two consistent quantitative trait loci (QTLs) were identified *qSmIA08* and *qSmIA02/B02*, located on chromosomes A08 and B02, respectively. The QTL *qSmIA08* explained 17,52% of the phenotypic variance, while *qSmIA02/B02* explained 9,06% of the phenotypic variance. Both QTLs reduced smut incidence by 57% and were stable over the three years of evaluation. The genome regions containing the QTLs were rich in R-genes. The study of the RIL population with resistance derived from wild species constitute an important advance for the development of new peanut varieties resistant to peanut smut. Conclusively, one major QTL and a minor QTL identified in this study provide new insights into the genetic architecture of peanut smut resistance that may aid in breeding new varieties resistant to peanut smut that would recover the productive potential of the peanut cluster in Argentina, in terms of money that means approximately US\$ 150 billion.

**Key words:** *Arachis* - genetic variability - resistance - Peanut Smut – QTLs

## Tabla de contenidos

Lista de figuras y tablas.....	XI
CAPITULO I.....	1
ANTECEDENTES.....	1
El Maní.....	1
Origen del maní y características del género <i>Arachis</i> .....	1
<b>Estado actual de los recursos genéticos</b> .....	6
<b>El mejoramiento genético del maní</b> .....	8
<b>Métodos de transferencia de genes desde las especies silvestres</b> .....	9
<b>Herramientas moleculares y genómicas aplicadas al mejoramiento</b> .....	10
El carbón del maní.....	12
OBJETIVOS.....	14
GENERAL.....	14
ESPECÍFICOS.....	14
HIPÓTESIS.....	14
<b>Estructura de la Tesis</b> .....	15
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	16
CAPÍTULO II.....	23
ORIGEN Y DESARROLLO DEL MATERIAL VEGETAL.....	23
<b>Identificación de especies silvestres resistentes</b> .....	23
<sup>a</sup> Designación del genoma según Robledo <i>et al.</i> , 2010 y Robledo & Seijo, 2010; <sup>b</sup> A: anual; P: perenne.....	25
Hibridación interespecífica, obtención de un híbrido anfidiplóide.....	26
Desarrollo de una población de líneas recombinantes endocriadas (RILs).....	26
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29
CAPÍTULO III.....	31
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL CARBÓN DEL MANÍ.....	31
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>Caracterización morfológica</b> .....	33
<b>Evaluación fenotípica de la resistencia a carbón del maní</b> .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>Caracterización morfológica</b> .....	42
<b>Evaluación fenotípica de resistencia al carbón del maní</b> .....	59



<b>DISCUSIÓN</b> .....	65
<b>Caracterización morfológica</b> .....	65
<b>Correlación entre los caracteres morfológicos</b> .....	67
<b>Evaluación fenotípica de resistencia al carbón del maní</b> .....	67
<b>Correlación entre los caracteres morfológicos y el carbón del maní</b> .....	68
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	69
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	70
CAPITULO IV.....	74
<b>CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PROXIMAL Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS</b> ....	74
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	74
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	79
<b>Material vegetal</b> .....	79
<b>Determinación del contenido de humedad, grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales</b> .....	79
<b>Composición de ácidos grasos</b> .....	82
<b>Valores de iodo</b> .....	82
<b>Caracterización genotípica de los materiales para los genes <i>AhFAD2</i> por AS-PCR</b> .....	83
<b>Análisis estadístico</b> .....	85
<b>RESULTADOS</b> .....	87
<b>Determinación del contenido de grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales</b> .....	87
<b>Grasas totales</b> .....	88
<b>Proteínas</b> .....	89
<b>Cenizas</b> .....	89
<b>Fibras</b> .....	89
<b>Azúcares totales</b> .....	90
<b>Composición de ácidos grasos</b> .....	93
<b>Valores de Iodo</b> .....	98
<b>Caracterización genotípica de los materiales para los genes <i>AhFAD2</i> por AS-PCR</b> .....	99
<b>DISCUSIÓN</b> .....	101
<b>Determinación del contenido de grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales</b> .....	101
<b>Contenido de grasas totales</b> .....	101
<b>Contenido de proteínas</b> .....	103

<b>Contenido de cenizas</b> .....	104
<b>Contenido de fibras</b> .....	104
<b>Contenido de azúcares totales</b> .....	105
<b>Composición de ácidos grasos</b> .....	106
<b>Caracterización genotípica de los materiales para los genes <i>AhFAD2</i> por AS-PCR.</b> .....	107
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	110
<b>CAPITULO V</b> .....	114
<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA POBLACIÓN, CONSTRUCCIÓN DE UN   MAPA GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTL PARA RESISTENCIA AL CARBÓN DEL MANÍ</b> .....	114
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	114
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	117
<b>Material vegetal</b> .....	117
<b>Caracterización molecular del anfidiplóide con marcadores SSR</b> .....	117
<b>Medición y análisis de los marcadores SSR</b> .....	118
<b>Confirmación de la condición trihíbrida del anfidiplóide</b> .....	118
<b>Genotificado con marcadores SNPs</b> .....	119
<b>Curado de datos de los marcadores SNP</b> .....	119
<b>Construcción de un mapa genético</b> .....	122
<b>Análisis de QTL</b> .....	124
<b>Identificación de genes candidatos en los intervalos de los QTLs</b> .....	125
<b>RESULTADOS</b> .....	125
<b>Caracterización molecular del anfidiplóide por SSR y SNPs</b> .....	125
<b>Evaluación del mapa genético</b> .....	136
<b>QTL para la resistencia al carbón del maní</b> .....	138
<b>Identificación de genes candidatos de resistencia al carbón del maní</b> .....	143
<b>DISCUSIÓN</b> .....	144
<b>Caracterización molecular del anfidiplóide</b> .....	144
<b>Caracterización genotípica de la población interespecífica de RILs con SNPs y       mapeo genético de la resistencia al carbón</b> .....	145
<b>QTL para resistencia al carbón del maní</b> .....	149
<b>Identificación de genes candidatos para la resistencia al carbón del maní</b> .....	151
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	152
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	154

<b>CAPITULO VI</b> .....	159
<b>CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	159
<b>ANEXOS</b> .....	163

## Lista de figuras y tablas

<b>Figura 2.1</b> Mapa de la provincia de Córdoba con el detalle de la ubicación de la parcela experimental del Criadero El Carmen.....	22
<b>Figura 2.2</b> Esquema de frutos típicos de las especies silvestres de <i>Arachis</i> .....	23
<b>Figura 3.1</b> Ejemplar herborizado para la medición de los caracteres cuantitativos, vegetativos y reproductivos.....	35
<b>Figura 3.2</b> Imágenes de frutos y semillas representativas de la variabilidad de los caracteres reproductivos medidos en 103 RILs derivadas del cruzamiento de un anfidiplóide y una línea experimental <i>A. hypogaea</i> .....	36
<b>Figura 3.3</b> Imágenes de las plantas a campo representativas de la variabilidad de los caracteres vegetativos medidos en 103 RILs derivadas del cruzamiento de un anfidiplóide y una línea experimental <i>A. hypogaea</i> .....	36
<b>Figura 3.4</b> Escala de severidad de carbón del maní.....	39
<b>Figura 3.5</b> Histogramas de la distribución de los valores de los caracteres morfológicos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: <i>A. hypogaea</i> y anfidiplóide y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	43
<b>Figura 3.6</b> Comparación de medias por el método de Scott and Knott de caracteres morfológicos de una población interespecífica de 103 RILs y sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide).....	47
<b>Figura 3.7</b> Correlaciones entre caracteres morfológicos medidos en una población interespecífica de 103 RILs y sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y anfidiplóide).....	52
<b>Figura 3.8</b> Dendrograma generado a partir del análisis de conglomerados jerárquicos de la matriz de distancia euclídea entre los genotipos de una población interespecífica de 103 RILs y sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y los silvestres que dieron origen al anfidiplóide.....	54
<b>Figura 3.9</b> Gráficos resultantes del análisis de componentes principales de los caracteres morfológicos medidos en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide.....	58
<b>Figura 3.10</b> Distribución de las variables transformadas de índice de enfermedad (IE) (A) e incidencia (B) de carbón del maní, evaluado en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide.....	59
<b>Figura 3.11</b> Correlación de Pearson entre las variables transformadas de incidencia e IE de carbón del maní, evaluado en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide.....	60
<b>Figura 3.12</b> Representación de la incidencia promedio interanual registrada para el carbón del maní en las 103 RILs derivadas del cruzamiento de una línea <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide.....	61
<b>Figura 3.13</b> Gráfico de las correlaciones significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre caracteres morfológicos e incidencia del carbón del maní, medidos en una población interespecífica de 103 RILs, y sus progenitores <i>A. hypogaea</i> y anfidiplóide.....	62
<b>Figura 3.14</b> Distribución de las 29 RILs resistentes al carbón del maní sobre el dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos.....	63
<b>Figura 4.1</b> Vía metabólica de los ácidos grasos en maní ( <i>Arachis hypogaea</i> ) adaptado de Chen <i>et al.</i> , 2019.....	76

<b>Figura 4.2</b> Variación de la composición química proximal de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	86
<b>Figura 4.3</b> Histogramas de la distribución de los valores de composición química proximal de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	87
<b>Figura 4.4</b> Comparación de medias por el método de Scott and Knott de los parámetros químicos proximales de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	91
<b>Figura 4.5</b> Cromatograma de CG representativo.....	92
<b>Figura 4.6</b> Composición de ácidos grasos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	94
<b>Figura 4.7</b> Histogramas de la distribución de los valores de composición ácidos grasos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	94
<b>Figura 4.8</b> Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos a partir de una matriz de distancias euclídeas de la composición de ácidos grasos entre los genotipos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	95
<b>Figura 4.9</b> Gráficos de los componentes principales de composición de ácidos grasos medidos en de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores ( <i>A. hypogaea</i> y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.....	97
<b>Figura 5.1</b> Ejemplo de gráficos de las alternativas genotípicas que pueden presentarse en el análisis de SNP en un panel tetraploide.....	120
<b>Figura 5.2</b> Gráfico de anillo mostrando el porcentaje de contribución alélica de los progenitores silvestres a la constitución genómica del anfidiplóide revelada con 235 SSRs.....	126
<b>Figura 5.3</b> Gráfico de anillo mostrando el porcentaje de contribución alélica de los progenitores silvestres a la constitución genómica del anfidiplóide revelada con 220 SNPs.....	128
<b>Figura 5.4</b> Mapa de ligamiento construido para la población de 103 RILs derivadas del cruzamiento de <i>A. hypogaea</i> JS17304-7-B × el anfidiplóide artificial JS1806.....	134
<b>Figura 5.5</b> Análisis de colinearidad entre la posición genética de todos los grupos de ligamiento con la posición física de los mismos en las secuencias genómicas de referencia.....	136
<b>Figura 5.6</b> Gráfico de las fracciones de recombinación (diagonal superior) y valores de LOD.....	137
<b>Figura 5.7</b> Valores de LOD detectados en los cromosomas A08 y A02/B02 luego del análisis de detección de QTL por año.....	139
<b>Figura 5.8</b> QTL para la resistencia al carbón del maní.....	141
<b>Figura 5.9</b> Efecto fenotípico de los marcadores SNPs estrechamente ligados a los QTL que contribuyen a la resistencia del carbón del maní.....	142
<b>Figura 5.10</b> Esquema del desarrollo del fruto de <i>A. hypogaea</i> según Smith, (1950).....	144
<b>Tabla 2.1</b> Especies, accesiones, nivel de ploidía, genoma y ciclo de vida de los materiales usados para la evaluación de resistencia al carbón del maní durante los años 2003 a 2005.....	24
<b>Tabla 2.2</b> División de las líneas endocriadas (RILs) a partir de la generación F <sub>7</sub> .....	26

<b>Tabla 3.1</b> Caracteres morfológicos estudiados la población interespecífica de 103 RILs, los progenitores de la población ( <i>A. hypogaea</i> y anfídiploide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfídiploide.....	33
<b>Tabla 3.2</b> Estadísticas de resumen para los caracteres morfológicos usados para caracterizar una población interespecífica de 103 RILs.....	49
<b>Tabla 3.3</b> Valores del índice de Shannon–Weaver para cada descriptor morfológico medido en una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: <i>A. hypogaea</i> y anfídiploide.....	50
<b>Tabla 4.1</b> Cebadores utilizados en las PCR según Chen <i>et al.</i> , 2010 para la caracterización de las mutaciones de los genes <i>AhFAD2A</i> y <i>AhFAD2B</i> .....	83
<b>Tabla 4.2</b> Recodificación de la amplificación de los cebadores F435Fw, F435IC-Rv, F435Wt-Rv, F435subs-Rv y F435ins-Rv.....	84
<b>Tabla 4.3</b> Análisis del ajuste la segregación fenotípica para la composición de ácidos grasos.....	98
<b>Tabla 4.4</b> Análisis del ajuste la segregación genotípica para la composición de ácidos grasos.....	99
<b>Tabla 5.1</b> Alelos específicos de las especies silvestres, del anfídiploide y compartidos entre las especies silvestres y el anfídiploide.....	125
<b>Tabla 5.2</b> Marcadores que revelaron alelos especie específicos de las tres especies silvestres diploides de <i>Arachis</i> que fueron encontrados en el genoma del anfídiploide.....	126
<b>Tabla 5.3</b> SNPs específicos de las especies silvestres, del anfídiploide y compartidos entre las especies silvestres y el anfídiploide.....	127
<b>Tabla 5.4</b> Estadísticas de resumen para el mapa genético obtenido mediante el análisis de una población de 103 RILs.....	134
<b>Tabla 5.5</b> Análisis por año de los QTLs asociados a la resistencia al carbón del maní detectados en una población interespecífica de RILs de <i>Arachis</i> .....	138
<b>Tabla 5.6</b> Detalle de los QTL detectados en una población interespecífica de RILs de <i>Arachis</i> con en el modelo de regresión Halley-Knott.....	139
<b>Tabla 5.7</b> Comparaciones de a pares entre grupos de RILs portando diferentes combinaciones de alelos en la posición de los SNPs en los picos de qSmIA08 y qSmIA02/B02.....	142

## Lista de abreviaturas y/o símbolos

$\alpha$ : alpha

A.: *Arachis*

ACP: Análisis de Componentes Principales.

AMOVA: Análisis Molecular de la Varianza

ANAVA: Análisis de la Varianza

AS-PCR: *Allele-Specific Polymerase Chain Reaction*

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bat: *Arachis batizocoi*

card: *Arachis cardenasii*

corr: *Arachis correntina*

CP: Componente Principal

CTES: Corrientes

EMAG: Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos

FAD2: *Fatty acid desaturase 2*

g: gramos

h: horas

ICRISAT: *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*

IE: Índice de Enfermedad

InDel: Inserción Delección

LOD: *Logarithm of Odds*

m: metros

min: minutos

mL: mililitros

ng: nanogramos

NPRL: *National Peanut Research Laboratory*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PIC: *Polymorphic Information Content*

QTL: *Quantitative/Qualitative Trait Loci*

RIL: *Recombinant Inbred Lines*

RUTF: *Ready to Use Therapeutic Food*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR: *Simple Sequence Repeat*

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

$\mu\text{L}$ : microlitro

$\mu\text{M}$ : micromoles

V.I.: Valor de Iodo

WT: *Wild Type*



## CAPITULO I

### ANTECEDENTES

#### El Maní

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo industrial sembrado en un área de 27,9 millones de hectáreas alrededor del mundo, con una producción anual de 47,1 millones de toneladas. Entre los mayores productores del mundo, Asia alcanza el 62,5% de la producción mundial, liderados por China (36,3%) e India (19,5%), seguidos por África con el 26,1% y, finalmente, América con el 11,3% (FAOSTAT, 2019). Argentina se ubica en el puesto 7mo a nivel mundial con el 3% de producción de maní en caja, siendo además, uno de los mayores exportadores de productos de maní con aproximadamente 1 millón de toneladas anuales (FAOSTAT, 2019). Este cultivo es comercialmente importante como una de las fuentes primarias de aceite vegetal, productos comestibles manufacturados y otros alimentos procesados. El maní es una fuente importante de proteínas y nutrientes, siendo usado en preparaciones tradicionales como parte de la alimentación diaria (Settaluri *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 1991). Se ha demostrado que el maní es una excelente fuente de compuestos como resveratrol, ácidos fenólicos, flavonoides y fitosteroles (Arya *et al.*, 2016). También es una buena fuente de co-enzima Q10 y contiene los 20 aminoácidos (Arya *et al.*, 2016).

#### Origen del maní y características del género *Arachis*

*Arachis hypogaea* es un aloploiploide (AABB,  $2n = 4x=40$ ) (Husted, 1936) segmentario (Leal Bertioli *et al.*, 2018). Existe suficiente evidencia, incluyendo estudios citogenéticos, filogeográficos y moleculares que confirman a *A. duranensis* como la especie silvestre donante del subgenma A y a *A. ipaënsis* como donante del subgenoma B (Grabiele *et al.*, 2012; Kochert *et al.*, 1996; Moretzsohn *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2006; Robledo *et al.*, 2009; Robledo y Seijo, 2010; Seijo *et al.*, 2007, Bertioli *et al.*, 2016). El origen de la especie se atribuye a un evento único de hibridación entre estas dos especies

diploides y una posterior duplicación cromosómica espontánea o por unión de gametas no reducidas (2n) (Bertioli *et al.*, 2016; Bertioli *et al.*, 2019; Grabiele *et al.*, 2012; Halward *et al.*, 1992; Kochert *et al.*, 1996; Moretzsohn *et al.*, 2013; Seijo *et al.*, 2004; Seijo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2020). Se ha propuesto que la hibridación de la que resultó *A. hypogaea* se habría producido hace aproximadamente 10000-15000 años (Bertioli *et al.*, 2019, Bertioli *et al.*, 2020) y que fue posible probablemente gracias al transporte humano de *A. ipaënsis* desde la chiquitanía Boliviana (donde se distribuyen principalmente las especies con genoma B) al área de distribución natural de *A. duranensis* (Bertioli *et al.*, 2016). El genoma del maní tiene un tamaño de ~2,7 Gb (Giga bases) que es aproximadamente la suma de los genomas de *A. duranensis* y *A. ipaënsis*, 1,25 Gb y 1,56 Gb, respectivamente (Samoluk *et al.*, 2015; Bertioli *et al.*, 2019). Se ha demostrado que del cruzamiento entre un alotetraploide artificial IpaDur (*A. ipaënsis* K30076 × *A. duranensis* V14167)<sup>4x</sup> y una línea de maní cultivado (Fávero *et al.*, 2006) resultó una progenie fenotípicamente normal, vigorosa y altamente fértil, lo que sustenta la estrecha relación de los genomas de esas especies silvestres con los subgenomas del maní cultivado (Shirasawa *et al.*, 2013). De acuerdo al porcentaje de similitud del ADN, se ha demostrado que la única accesión conocida KG30076 de *A. ipaënsis*, es descendiente de la población donante del subgenoma B a *A. hypogaea* (99,96% similitud de ADN). Por otro lado, *A. duranensis* es la especie que donó el subgenoma A a *A. hypogaea*. De acuerdo a los análisis de secuencias de ADN de cloroplastos y del 5S ADNr, la población de Río Seco fue propuesta como la mejor candidata (Grabiele *et al.*, 2012). De acuerdo a la similitud de ADN genómico, se han propuesto cuatro poblaciones como las mejores candidatas donantes del subgenoma A del maní: dos accesiones de Río Seco, Argentina KGBSPSc 30065/PI-468202 y KGBSPSc 30067/PI-468201, (99,57% de similitud), la accesión V14167 (99,61% de similitud, de Salta) y la accesión PI-475845 (98,23% de similitud) (Bertioli *et al.*, 2016; Bertioli *et al.*, 2019).

El maní pertenece al género *Arachis* (*Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae*, subtribu *Stylosanthinae* y tribu *Aeschynomeneae*) junto con otras 82 especies formalmente reconocidas (Krapovickas y Gregory, 1994; Valls y Simpson, 2005; Santana *et al.*, 2015; Valls y Simpson, 2017) y endémicas de Sud América. El área del género se extiende desde los Andes, sur de Amazonas, norte de la Planicie Platina y noreste de Argentina, hasta el noreste de Brasil (Gregory *et al.*, 1979; Krapovickas y Gregory, 1994). Taxonómicamente,

las especies se agrupan en nueve secciones - *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* con sus series *Prorhizomatosae* y *Rhizomatosae*, *Trierectoides* y *Triseminatae* - de acuerdo a la distribución geográfica, morfología y compatibilidad reproductiva (Krapovickas y Gregory, 1994). El maní cultivado se encuentra dentro de la sección *Arachis* junto con 29 especies silvestres diploides ( $2n = 2x = 20$  y  $2n=2x=18$ ), incluyendo sus progenitores silvestres y el alotetraploide silvestre *A. monticola* que sería el antecesor directo no domesticado del cultígeno (Seijo *et al.*, 2004).

Krapovickas y Gregory (1994) presentaron un trabajo monográfico en 1994 sintetizando la colección, ordenamiento y clasificación realizada a lo largo de 35 años por un grupo de investigadores nacionales en colaboración con otros de Brasil y Estados Unidos. Con el trabajo realizado en ese periodo se constituyen gran parte las colecciones de los materiales silvestres y cultivados disponibles en el mundo y se realizaron los trabajos de referencia taxonómica en el género. En Argentina, mediante este trabajo se construyó la base documental del material de referencia para *Arachis* en el herbario (CTES) del IBONE (UNNE-CONICET), así como las colecciones de germoplasma del INTA Manfredi y del IBONE. En dicha monografía, los autores señalan que los caracteres más significativos para la identificación de las secciones del género *Arachis* residen en sus estructuras subterráneas, incluyendo sus frutos, tallos rizomatosos, sistemas radicales e hipocótilos, mientras que los caracteres de las partes aéreas y los micromorfológicos, como el tipo y abundancia de pelos y cerdas foliares, se suman como importantes para la distinción de especies dentro de cada sección. Muestran, además, que estos caracteres determinantes tienden a aglomerar las colecciones en diferentes grupos que se asocian con áreas geográficas y formaciones ecológicas. Krapovickas *et al.*, (2007) se refieren a la variabilidad exomorfológica intraespecífica de algunas especies del género como una característica propia del género.

En el maní cultivado, en particular, la variación exomorfológica se presenta en caracteres tales como longitud del ciclo de vida, tamaño, color y forma de las hojas, pubescencia, estructura de la ramificación, presencia de flores y frutos en las ramas o en el eje central o en ambos, disposición de los frutos en las ramas, fortaleza de los clavos, hábito de crecimiento. En cuanto a los caracteres reproductivos, los diferentes genotipos presentan gran variación en el tamaño, estructura y forma de los frutos así como en el

tamaño, forma y color de las semillas, y en la presencia o ausencia de dormición de las semillas (Krapovickas y Gregory, 1994). Las diferentes combinaciones de los estados de los caracteres mencionados se manifiestan en más de 100 razas locales descritas para el cultivo en Ecuador, Bolivia, Perú, Guatemala (Krapovickas *et al.*, 2009; Krapovickas *et al.*, 2013; Williams, 2001; Williams, 1991). Las mismas presentan una gran diversidad morfológica y ecológica en razas locales de maní del Beni (Bolivia) con adaptaciones a diversos agroecosistemas.

La actual clasificación infraespecífica de *A. hypogaea* fue propuesta por Krapovickas *et al.*, (1960) y por Krapovickas y Gregory, (1994). En la clasificación reconocen dos subespecies *ssp. hypogaea* y *ssp. fastigiata*. En base a la alta diversidad exomorfológica y fisiológica las razas locales han sido agrupadas en seis variedades botánicas: *hypogaea e hirsuta* en la subespecie *hypogaea*; y *fastigiata, aecuatoriana, peruviana* y *vulgaris* en la subespecie *fastigiata* (Krapovickas y Gregory, 1994). Se propusieron seis genocentros o centros de variabilidad del maní cultivado en Sudamérica, el primario en la región noroeste de Argentina y sur de Bolivia, y cinco centros secundarios, uno en la costa de Perú y los otros cuatro en la gran área guaraníca (Krapovickas, 1968; Krapovickas, 1973).

El maní cultivado es altamente susceptible a varias enfermedades y plagas, incluyendo roya (*Puccinia arachidis* Speg.), viruela temprana del maní (*Cercospora arachidicola* S. Hori.) viruela tardía del maní [*Cercosporidium paersonatum* (Berk. y M.A. Curtis) Deighton.] y las causadas por hongos patógenos del suelo que afectan el fruto y granos [*Thecaphora frezii* Carranza y Lindquist, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. y *Sclerotium rolfii* Sacc.] (Holbrook y Stalker, 2003). Esta situación llevó a la aplicación de cantidades crecientes de agroquímicos con impacto negativo sobre los costos de producción y el medio ambiente. La combinación de los efectos de la poliploidía, el fenómeno de domesticación, el sistema reproductivo autógamo, pero principalmente el empleo continuo de pocos ancestros comunes para originar variedades mejoradas, generó una base genética reducida para el desarrollo de nuevas variedades resistentes a estreses abióticos y bióticos (Holbrook y Stalker, 2003; Isleib *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2014). Es por esto que la búsqueda de resistencia a plagas y enfermedades se ha convertido en un objetivo primordial en los programas de mejoramiento de maní. Sin embargo, no se han encontrado fuentes de resistencia en el acervo genético primario de *A. hypogaea* para muchos de los patógenos que atacan a las variedades comerciales (Stalker, 2017).

Por el contrario, las especies silvestres del género *Arachis* son una gran fuente de genes de resistencia a enfermedades foliares y de suelo de origen fúngico, así como de otros caracteres de interés agronómico. Es por esto que, desde hace algunos años, se han comenzado a desarrollar diversos métodos de introgresión de caracteres provenientes de germoplasma silvestre al maní cultivado. El pre-mejoramiento se ha constituido como la vía más exitosa para utilizar los recursos genéticos de especies silvestres disponibles en los distintos bancos de germoplasma del mundo en los programas de mejoramiento del maní, (Simpson y Starr, 2001; Fávero *et al* 2005, 2020, Mallikarjuna y Varshney, 2014, García *et al.*, 2020). Entre los ejemplos de la introgresión de alelos de las especies silvestres en variedades comerciales por pre-mejoramiento se encuentran los cultivares registrados por Simpson y Starr, (2001) y Simpson *et al.*, (2003), que mediante la incorporación de material genético de tres especies silvestres (*A. cardenasii*, *A. diogeni* y *A. batizocoi*) presentaron una reducción en un 90% de la infestación de nemátodos comparados con los cultivares no resistentes.

Asimismo, a partir de cruzamientos directos de *A. hypogaea* con especies silvestres (con *A. cardenasii*, *A. correntina* y *A. batizocoi*) por vía de la obtención de un hexaploide (Singh, 1987; Stalker y Moss, 1987) o mediante la obtención de híbridos anfidiplóides [(*A. batizocoi* × *A. kempff-mercadoi*)<sup>4x</sup>, (*A. gregoryi* × *A. stenosperma*)<sup>4x</sup>, (*A. magna* × *A. cardenasii*)<sup>4x</sup>] permitieron la selección de materiales cultivados resistentes a viruela temprana del maní (causada por *Cercospora arachidicola* S. Hori), viruela tardía del maní (causada por *Cercosporidium personatum* (Berk. and Curt.) Deighton] (Moss *et al.*, 1981; Wynne *et al.*, 1989; Stalker y Wynne, 1979), tizón del maní [causada por *Sclerotinia minor* Jagger and *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary] (Tallury *et al.*, 2014), podredumbre negra del maní [causada por *Cylindrocladium crotalariae* (C.A. Loos) D.K. Bell y Sobers] (Tallury *et al.*, 2014; Simpson *et al.*, 2003) y resistencia a varias plagas de insectos (Stalker y Lynch, 2002; Michelotto *et al.*, 2017, Fávero *et al.*, 2020). La reciente liberación de un cultivar resistente al carbón del maní por el Criadero El Carmen (Soave, com. pers.) utilizando *A. monticola*, único tetraploide silvestre de la sección *Arachis*, se constituyó en el primer caso de introgresión de caracteres a partir de especies silvestres a las variedades comerciales del país.

Si bien la incorporación de genes silvestres al maní aumenta la variabilidad genética y mejoramiento del cultígeno, se ha señalado que al mismo tiempo tiende a perjudicar el

rendimiento y la calidad del grano (Holbrook y Stalker, 2003). Por este motivo, es importante que al mismo tiempo que se recupera rendimiento en las líneas avanzadas de introgresión, se monitoreen los atributos nutricionales y químicos de los granos para garantizar la calidad nutricional de las mismas y así, mantener los mercados que demandan maní.

## **Estado actual de los recursos genéticos**

### **El germoplasma primario**

La colección conservada en el INTA Manfredi y en el Banco base de INTA Castelar está constituida por 106 accesiones de especies silvestres y 3534 accesiones de *Arachis hypogaea* (Sánchez *et al.*, 2010). De la colección total, el 80 % fue recolectada en expediciones a los centros de diversidad del género y de la especie domesticada (Argentina, Bolivia, Paraguay, Brasil, Perú, Ecuador, Uruguay, etc.) en una estrecha colaboración interinstitucional e internacional integrada principalmente por los Ingenieros Agrónomos J. Rigoni, A. Krapovickas, W. Gregory, J. Valls y C. Simpson. Las accesiones restantes de *A. hypogaea* fueron donadas por centros internacionales de investigación.

La colección de germoplasma mantenida en el IBONE cuenta con un total of 688 accesiones. Estas incluyen 216 accesiones de razas locales de maní del NE de la Argentina mantenidas actualmente por productores locales (Pérez *et al.*, 2018, Seijo *et al.*, 2019), y 472 accesiones de especies silvestres. Además, actualmente cuenta con 213 híbridos interespecíficos de especies silvestres (Seijo, 2020 informe para Global Peanut Strategy document). Las accesiones mantenidas en el IBONE tienen algunas duplicaciones con las mantenidas en el Banco del INTA Manfredi, pero la mayoría proviene de nuevas colecciones realizadas en el área natural de distribución de las especies silvestres durante los últimos 20 años y de colecciones de razas locales mantenidas *in situ* por los productores familiares no industrializados en Argentina.

Existe otra colección de 145 razas locales de maní mantenida en el Criadero El Carmen, General Cabrera, Córdoba. Estos materiales en su mayoría son duplicaciones de los materiales mantenidos en INTA Manfredi, aunque también posee materiales de

adquisiciones propias. La colección también incluye una decena de especies silvestres, algunas de ellas establecidas en parcelas a partir de colecciones propias y otras son duplicaciones de materiales conservados en el IBONE.

Entre las dos instituciones públicas albergan una importante colección de materiales, erigiéndose como una de las colecciones Nacionales más importantes del mundo. La amplia representación de la variabilidad existente en el acervo primario y secundario del maní en los bancos de Argentina, constituye una fortaleza para emprender programas de mejoramiento centrados en la incorporación de la variabilidad de estos materiales a las variedades comerciales.

### **Importancia de la conservación del germoplasma secundario de *Arachis***

Las especies silvestres de *Arachis* presentan elevada variabilidad genética interespecífica e intraespecífica, y se encuentran en ambientes tan diversos como áreas pantanosas, praderas, suelos rocosos y áreas semiáridas (Krapovickas y Gregory, 1994). Ésta amplia diversidad genética de los parientes silvestres del cultígeno, tiene el potencial de ampliar su base genética y mejorar los niveles de resistencia a numerosas enfermedades y plagas (Holbrook y Stalker, 2003; Simpson, 2001; Stalker, 1997; Stalker, 2017; Suassuna, 2020).

La conservación de las especies silvestres emparentadas con el maní es importante por la diversidad genética que presentan. Por más de 60 años, se han realizado esfuerzos sistemáticos por coleccionar germoplasma de especies silvestres de *Arachis* que fuesen representativas del rango natural del género Krapovickas y Gregory, (1994). A pesar de ello, aún hay una cantidad significativa de la diversidad genética, presente en los acervos de genes secundarios y terciarios, que no se encuentra conservada en los bancos de germoplasma *ex situ*. Estos faltantes incluyen accesiones de varias especies que están representadas por una única o muy pocas accesiones y especies con amplia distribución geográfica pero pobremente representadas en los bancos. Entre muchas de esas especies silvestres sub-representadas se encuentran algunas de las involucradas en el origen y domesticación del maní cultivado o que al menos están muy relacionadas con el cultígeno (Jarvis *et al.*, 2003). Otros faltantes significativos incluyen el germoplasma de algunas especies nuevas del género *Arachis*, aún en estudio y no descritas formalmente, que

sobreviven en algunas de las áreas más remotas e inexploradas del este de Brasil, sudeste de Bolivia y noreste de Paraguay (Williams, 2001; Seijo, 2011).

En este contexto, se observa una acelerada pérdida de ecosistemas, especies, genes y variantes alélicas (Díaz *et al.*, 2006; Turcotte *et al.*, 2017; Walter & Gillett, 1997; Walter & Gillett, 1997). Walter y Gillett, (1997) detectaron que 34.000 especies vegetales estaban amenazadas en ese año, lo que equivale aproximadamente al 12,5% de la flora mundial. Estimaciones más actuales sugieren que del 20 al 35% de la diversidad genética vegetal podría perderse en los próximos 20 años (Turcotte *et al.*, 2017). Estos taxones incluyen especies de cultivo y sus parientes silvestres (genes de los cultivos) que son objeto de una preocupación particular desde la perspectiva de la conservación vegetal (Hufforf *et al.*, 2019) y sustentabilidad de la población humana en la tierra.

Los desafíos ambientales extremos a los que se enfrentan los cultivos requieren de un accionar rápido a la hora del mejoramiento recurriendo a los acervos genéticos disponibles para responder a la siempre dinámica y cambiante presencia de plagas y enfermedades, así como a las necesidades de los productores y consumidores. Por lo tanto, es indispensable que las colecciones de germoplasma sean lo suficientemente completas en material e información para anticiparse a esas necesidades. El uso de estos materiales en planes de mejoramiento y su valor para el sostenimiento de la agricultura moderna, más allá de su valor intrínseco para el mantenimiento de la biota, contribuirá al incremento de la importancia en la percepción pública y con esto se espera mejorar las acciones para su conservación en la naturaleza.

## **El mejoramiento genético del maní**

La evidencia arqueológica y lingüística muestra que las semillas de maní han sido consumidas por las civilizaciones sudamericanas durante miles de años antes de la colonización europea (Bonavia, 1982; Krapovickas, 2004; Dillehay, 2007). Krapovickas (2004) señala que fueron miembros de las poblaciones de cazadores-recolectores quienes realizaron los primeros “trabajos de mejoramiento genético”, por medio de la selección continua voluntaria e involuntaria de los mejores individuos para sus prácticas de agricultura. El cultivo de una gran variedad de razas locales en diferentes agroecosistemas, el uso diverso en la culinaria antigua y moderna de los pueblos originarios y criollos de



América del Sur y Central revela el desarrollo de materiales propios para cada sistema de producción y uso específico.

Hasta la finalización de la Segunda Guerra Mundial, los avances en el mejoramiento fueron poco notables para desarrollar materiales adaptados a la agricultura extensiva y mecanizada (Soave *et al.*, 2003). A partir de mediados del siglo pasado, varios países comenzaron a potenciar sus programas de mejoramiento genético y otros a iniciarlos. En los 25 años posteriores, se produjo una aceleración en el desarrollo de variedades, principalmente para el aumento en rendimiento y contenido de aceite. Así, Holbrook (*et al.*, 2014) señala que el mejoramiento de los cultivos, junto con avances en las prácticas agronómicas y de manejo resultaron en una ganancia promedio de 29,9 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>.

En la década de 1930, Washington Carver del instituto Tuskegee de Alabama describió más de 300 usos del maní cultivado. Los resultados de sus investigaciones contribuyeron a adoptar una política pública de promoción del consumo del grano en diferentes formas a partir de la edad escolar, difundir su alta y completa calidad alimenticia (Paterson *et al.*, 2004). En Argentina, los primeros pasos de mejoramiento genético del maní se dieron a partir de 1945 en la E.E.A. Manfredi, mediante los trabajos de V. Rigoni, J. Baez, A. Krapovickas y J. Pietrarelli (INTA Manfredi).

Las primeras variedades cultivadas en Córdoba procedieron de razas locales originarias del NE de Argentina, que comenzaron a cultivarse regionalmente en el siglo XIX. En el período que va desde 1950 hasta 1975, se difundieron los primeros cultivares obtenidos por cruzamientos artificiales dirigidos para obtener variedades con mayor contenido de aceite. La aparición del cultivar tipo rastrero (cv. “Florunner”), en 1969 en los EE.UU. provocó la primera “revolución genética” contemporánea, ya que su alto potencial de rendimiento y aptitud para diversos usos, en particular el consumo como maní confitero, la convirtieron en preferida de los productores y de la industria manisera estadounidense (Soave *et al.*, 2003). El desarrollo y adopción de estos cultivares tipo rastrero en Argentina amplió su condición de país exportador de maní de alta calidad, principalmente a otros países de occidente.

## **Métodos de transferencia de genes desde las especies silvestres**

La introgresión de alelos desde el germoplasma silvestre al maní cultivado está restringido a las especies de la sección *Arachis*, pero las diferencias en el nivel de ploidía entre las especies silvestres de *Arachis* y el maní cultivado hacen que la incorporación de alelos sea un desafío (Bertioli *et al.*, 2011; Dwivedi *et al.*, 2007; García *et al.*, 1995). Aun así, es posible sortear esta barrera genética para ampliar la base genética de *A. hypogaea* a través del desarrollo de genotipos poliploides sintéticos por diferentes vías (Burow *et al.*, 2001; Foncéka *et al.*, 2009; Foncéka *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2014; Leal-Bertioli *et al.*, 2017; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Simpson, 2001; Simpson *et al.*, 2003) resumidas en Simpson y Starr, (2001):

El método hexaploide incluye la obtención de un triploide entre *A. hypogaea* y un diploide silvestre que luego es tratado con colchicina para duplicar los cromosomas. El desarrollo de materiales promisorios requiere la reducción posterior del número cromosómico por aneuploidia espontánea y estabilización a nivel 4x.

El método de autopoliploidía inducida en especies parentales, implica el tratamiento independiente de dos especies diploides con colchicina para crear plantas autotetraploides y luego cruzarlas para obtener un alotetraploide que generalmente es parcialmente estéril.

El método del anfidiplóide, es la vía más efectiva y utilizada hasta el momento en programas de mejoramiento para la incorporación de alelos silvestres. Consiste en la hibridación de dos especies silvestres diploides (combinando genomas A y B u otros genomas emparentados de manera cercana) seguido por una duplicación del híbrido AB para producir un alotetraploide. Una variante de la alternativa de tres vías es el cruzamiento entre dos especies diploides de genoma A para producir un híbrido diploide, que luego es cruzado con una tercera especie diploide con genoma B o afín. Este híbrido de tres vías es tratado con colchicina para duplicar los cromosomas. Otra alternativa es el desarrollo de híbridos complejos mediante la hibridación de anfidiplóides obtenidos a partir del cruzamiento de diferentes parentales, resultando así materiales con constituciones genómicas provenientes de cuatro o más especies diploides (Fávero *et al.*, 2020).

## **Herramientas moleculares y genómicas aplicadas al mejoramiento**

Un marcador molecular es descripto como cualquier fenotipo molecular proveniente de la expresión de un gen o de un segmento específico de ADN correspondiente a regiones génicas o intergénicas, cuya secuencia puede ser conocida o no, y que presenta diferencias entre individuos con un patrón de heredabilidad específico y predecible (Ferreira *et al.*, 1998; Pozzi *et al.*, 2014). A diferencia de los marcadores morfológicos, los moleculares de ADN pueden ser utilizados para la detección y caracterización de genotipos a partir de células o tejidos en cualquier estadio fisiológico y de forma independiente del ambiente, facilitándose así la aplicación de métodos tempranos de selección de los individuos de interés para el mejoramiento genético (Morell *et al.*, 1995).

En maní se han utilizado diversos marcadores moleculares, entre ellos RFLPs (Kochert *et al.*, 1991), AFLPs (He y Prakash, 1997), microsatélites (SSRs, por sus siglas en inglés) (Hopkins *et al.*, 1999) o los nucleótidos simples polimórficos (SNPs, por sus siglas en inglés) (Zhou *et al.*, 2014). Para el maní cultivado, el polimorfismo detectado entre cualquier par de progenitores, frecuentemente oscila entre 5 y 10% (Holbrook *et al.*, 2016; Stalker y Mozingo, 2001).

Ozias-Akins, (2013) afirmó que el acceso a los métodos de secuenciación completa podría incrementar significativamente los marcadores SNPs para elevar la capacidad de análisis genómicos del maní y aproximarla a la disponible para otros cultivos. Desde el 2018 se cuenta con una plataforma de genotipificado con 47.116 marcadores SNPs polimórficos (48k SNP array for *Arachis*, Axiom *Arachis2*) identificados en variedades cultivadas, híbridos interespecíficos y accesiones silvestres. Esta plataforma permite procesar 384 muestras simultáneamente con un costo de ~ US\$ 63 por muestra.

Los avances en la tecnología de genética molecular permiten a los investigadores detectar de manera precisa polimorfismos genéticos así como identificar marcadores moleculares asociados a caracteres de loci cualitativos y cuantitativos para muchos caracteres agronómicos, fisiológicos y adaptativos (Holbrook *et al.*, 2016). Estos esfuerzos han resultado en grandes avances en el conocimiento del genoma del maní y facilitan la ejecución de programas de mejoramiento asistido por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés).

El proyecto de secuenciación del genoma del maní fue iniciado en 2012 utilizando el cultivar “Tifrunner” (Holbrook y Culbreath, 2007) como genotipo de referencia y fue

publicado en 2019 (Bertioli *et al.*, 2019). En la actualidad, la comunidad científica del maní puede acceder a la base de datos peanutbase.org donde se encuentran los genomas de referencia del maní cultivado (Bertioli *et al.*, 2019) así como de sus progenitores silvestres diploides (Bertioli *et al.*, 2016). En simultáneo, se publicó la secuencia del genoma de *A. hypogaea* var. “Shitouqi” (zh.h0235), un cultivar chino perteneciente a la subespecie *fastigiata*, el cual está disponible en <http://peanutgr.fafu.edu.cn> (Zhuang *et al.*, 2019) y la del cv “Fuhuasheng”, una raza local del norte de China var. *vulgaris* (número de accesión GH00910) cuya secuencia se encuentra depositada en DDBJ/ENA/GenBank con la accesión SDMP00000000 (Chen *et al.*, 2019). Para mejorar la calidad del ensamble del genoma tetraploide se usaron las secuencias de los dos progenitores silvestres (*Arachis duranensis* y *Arachis ipaënsis*) (Bertioli *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2017) y el genoma de *A. monticola* (Yi *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2020). La disponibilidad de las secuencias de los genomas mencionados han aumentado sensiblemente el potencial del análisis de las mismas, anotaciones, descubrimiento de genes candidatos y el desarrollo de nuevos marcadores.

## **El carbón del maní**

El carbón del maní es una enfermedad de suelo causado por el hongo *Thecaphora frezii* identificado por primera vez en muestras de maní silvestre de Aquidauana, Matto Grosso do Sul, Brasil, en 1962 (Carranza y Lindquist, 1962). Más tarde, se observaron frutos infectados en accesiones de *A. kempff-mercadoi* Krapov., W.C. Greg. y C.E. Simpson de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia (Soave *et al.*, 2014). La infección ocurre entre el comienzo de la elongación del ginóforo y la penetración del clavo al suelo. Se ha propuesto que cuando el mismo entra en contacto con el suelo, los exudados liberados por el clavo estimularían la germinación de las esporas, desencadenando infecciones locales (Marraro Acuña *et al.*, 2013). La infección del patógeno causa malformación del fruto con una marcada hipertrofia de los tejidos de las paredes del fruto. Asimismo, las células seminales colonizadas son consumidas por el hongo y reemplazadas por teliosporas en el estado reproductivo del mismo, otorgando a las semillas una apariencia de masa carbonosa, o el reemplazo total del tejido seminal por teliosporas (Astiz Gasso y Marinelli, 2013; March y Marinelli, 2005; Marraro Acuña *et al.*, 2013).

En la región centro-norte de la provincia de Córdoba se detectaron semillas con carbón durante la cosecha de 1995 (Marinelli *et al.*, 1995). Este fue el primer reporte de la enfermedad en lotes comerciales y desde entonces la enfermedad se ha dispersado en toda la región de producción intensiva de maní de Argentina, cubriendo una superficie superior a 2000 km<sup>2</sup>. Al estudiar la relación entre las variables medidas para estimar el daño de la enfermedad se observó una significativa correlación entre las pérdidas de rendimiento estimadas y la intensidad de la enfermedad (Paredes *et al.*, 2016). La estimación de las pérdidas de rendimiento en lotes con baja densidad de inóculo es errática, mientras que la correlación es alta cuando la densidad de inóculo se incrementa (Capello y Dignani, 2014). Estos autores hallaron que una incidencia de carbón del 14% puede ser considerado como el umbral de daño y estimaron que por cada punto de aumento de la incidencia se produce una caída del 1,2% del rendimiento. Las pérdidas de rendimiento en la campaña 2016, ascendieron al 35%, estimadas en 40 lotes con valores de incidencia que alcanzaron el 52% (Paredes *et al.*, 2016). Las estimaciones de pérdidas en 2016 alcanzaron una suma de 27.419 MT, representando el 3,15% del total de la producción de maní de Argentina (Rago *et al.*, 2017). Esta pérdida en la producción nacional de maní equivale a unos US\$14.151.800.

La mayor parte de los cultivares de Argentina son susceptibles a esta enfermedad. Sólo unos pocos cultivares comerciales, compuestos por dos variedades con bajo contenido de ácido oleico, exhiben un nivel moderado de tolerancia al carbón del maní (Pepe Asem INTA y Manígran) (Rago *et al.*, 2017) y un cultivar alto oleico EC-191-RC Ré, 2019. Estos materiales representan las alternativas genéticas disponibles actualmente conocidas para aumentar los rendimientos frente al problema instalado de la enfermedad. Se han ensayado diferentes alternativas para el control de la enfermedad, entre ellas el uso de diferentes fungicidas, y de diversas modificaciones culturales (rotaciones, etc.), pero ninguna de ellas fue suficientemente efectiva, además incrementaron significativamente los costos de producción (Rago *et al.*, 2017). Ante esta realidad, desde hace más de una década se han concentrado los esfuerzos en identificar fuentes de resistencia al carbón entre las razas locales antiguas y las especies silvestres conservadas en los bancos de germoplasma.

En el contexto mencionado, el “Criadero El Carmen” en conjunto con el CONICET, la Fundación Maní Argentino, la UNC y el IBONE, desarrollaron una población interespecífica de RILs mediante descendencia de semilla única, derivada del cruzamiento

entre una línea comercial de maní y un anfidiplóide, que es segregante para resistencia a carbón del maní. Esta población constituye un material biológico ideal para identificar las regiones genómicas asociadas con la resistencia a la enfermedad y caracterizar los patrones de herencia de los caracteres morfológicos y químicos.

En esta tesis se propone analizar este material con los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Caracterizar los atributos fenotípicos y genéticos de una población interespecífica de RILs derivadas del cruzamiento: {*Arachis hypogaea* subsp. *hypogaea* (JS17304-7-B) × anfidiplóide sintético (JS1806) [*A. correntina* (K 11905) × *A. cardenasii* (KSSc 36015)] × *A. batizocoi* (K 9484)<sup>4x</sup>} segregante para la resistencia al carbón del maní (*Thecaphora frezii*).

### **ESPECÍFICOS**

- o Caracterizar fenotípicamente a la población interespecífica de RILs.
- o Caracterizar genotípicamente a la población interespecífica de RILs mediante marcadores moleculares SSRs y SNPs.
- o Caracterizar parámetros de calidad química de la población interespecífica de RILs.
- o Caracterizar genotípicamente las variantes del gen *AhFAD2* en la población interespecífica de RILs.
- o Construir un mapa genético.
- o Identificar regiones genómicas asociadas al carbón. Explorar los intervalos genómicos asociados para identificar genes candidatos que asociados a la resistencia al carbón del maní.

## **HIPÓTESIS**

1- La población interespecífica de RILs es variable para los caracteres morfológicos utilizados en la caracterización fenotípica del maní cultivado y para la resistencia al carbón del maní (*Thecaphora frezii*).

2- La población interespecífica de RILs es variable para los parámetros químicos proximales y perfiles de ácidos grasos.

3- La variabilidad fenotípica de la resistencia al carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en una población interespecífica de RILs está asociada a marcadores genéticos variables tipo SSR y/o SNPs, ligados, a su vez, a los genes que confieren dicha resistencia.

4- Los marcadores moleculares utilizados para caracterizar genotípicamente a la población interespecífica de RILs podrán ser usados para construir un mapa genético.

5- La densidad del mapa genético permitirá la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL).

## **Estructura de la Tesis**

En el capítulo II se presenta el desarrollo del anfidiplóide y de la población de RILs motivo de este trabajo de tesis.

En el capítulo III se aborda la caracterización fenotípica de las RILs por su macromorfometría y resistencia al carbón del maní.

En el capítulo IV se caracteriza a la población de RILs por su composición química proximal y el perfil de 10 ácidos grasos.

En el capítulo V se presenta la caracterización molecular de la población interespecífica de RILs, la construcción de un mapa genético y el análisis de detección de QTL. Además, se identifican los genes candidatos de resistencia al carbón del maní, presentes en los intervalos de los QTL.

Finalmente, en el capítulo VI se presentan las consideraciones finales del trabajo de tesis y la proyección de investigación a partir de la misma.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arya, S. S., Salve, A. R., and Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1): 31–41.
- Astiz Gasso, M. M., and Marinelli, A. (2013). Biología de la germinación de *Thecaphora frezii in vitro*. Jornada Nacional de maní. 28. 2013 09 19, 19 de Setiembre 2013. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., and Bera, T. (2015). Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Academic Press.
- Bertioli, D. J., Cannon, S. B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A. D., Cannon, E. K., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., and others. (2016). The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*, 48(4): 438.
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Clevenger, J., Dudchenko, O., Gao, D., Seijo, G., Leal-Bertioli, S. C., Ren, L., Farmer, A. D., Pandey, M. K., and others. (2019). The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. *Nature Genetics*, 51(5): 877–884.
- Bertioli, D. J., Seijo, G., Freitas, F. O., Valls, J. F., Leal-Bertioli, S. C., and Moretzsohn, M. C. (2011). An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources*, 9(1): 134–149.
- Bonavia, D. (1982). Los Gavilanes: Prececerámico peruano: Mar, desierto y oasis en la historia del hombre. Corporación Financiera de Desarrollo Oficina de Asuntos Culturales. Burow, M. D., Simpson, C. E., Starr, J. L., and Paterson, A. H. (2001). Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics*, 159(2): 823–837.
- Carranza, J., and Lindquist, J. (1962). *Thecaphora frezii* n. Sp., parásita de *Arachis* sp. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 10(1): 11–18.
- Chen, X., Lu, Q., Liu, H., Zhang, J., Hong, Y., Lan, H., and Pandey, M. K. (2019). Sequencing of cultivated peanut, *Arachis hypogaea*, yields insights into genome evolution and oil improvement. *Molecular plant*, 12(7): 920-934.
- Del Pilar De Souza Peñaloza, A., and Valls, J. F. M. (2005). Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis (leguminosae)*. *Bonplandia*, 65–72.
- Díaz, S., Fargione, J., Chapin III, F. S., and Tilman, D. (2006). Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biol*, 4(8): e277.
- Dillehay, T. D., Rossen, J., Andres, T. C., and Williams, D. E. (2007). Prececeramic adoption of peanut, squash, and cotton in northern Peru. *Science*, 316(5833): 1890-1893.
- Dwivedi, S., Bertioli, D., Crouch, J., Valls, J., Upadhyaya, H., Fávero, A., Moretzsohn, M., and Paterson, A. (2007). Peanut. In *Oilseeds* (pp. 115–151). Springer.
- Fávero, A. P., Simpson, C. E., Valls, J. F., and Vello, N. A. (2006). Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, a *Duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Science*, 46(4): 1546–1552.
- Fávero, A. P., Custodio, A. R., Dinato, N. B., Godoy, I. J. D., Seijo, J. G., and Michelotto, M. D. (2020). Transference of multiple resistance to peanut through the development



- of cross-compatible complex hybrids of wild *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2).
- Ferreira, M. E., Fernández, J. N., and Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa Federal District, Brazil.
- Foncela, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoye, O., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2012). Fostered and left behind alleles in peanut: Interspecific qtl mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biology*, 12(1): 26.
- Foncela, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M. N., Ndoye, O., Fávero, A. P., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2009). Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: A way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. *BMC Plant Biology*, 9(1): 103.
- Foncela, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoye, O., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2012). Fostered and left behind alleles in peanut: Interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biology*, 12(1): 26.
- García, A. V., Ortiz, A. M., Silvestri, M. C., Custodio, A. R., Moretzsohn, M. C., and Lavia, G. I. (2020). Occurrence of 2n microspore production in diploid interspecific hybrids between the wild parental species of peanut (*Arachis hypogaea* L., *Leguminosae*) and its relevance in the genetic origin of the cultigen. *Crop Science*, 60(5): 2420-2436.
- García, G., Stalker, H., and Kochert, G. (1995). Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using rflp and rapd markers. *Genome*, 38(1): 166–176.
- Grabiele, M., Chalup, L., Robledo, G., and Seijo, G. (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast dna sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 298(6): 1151–1165.
- Gregory, M. P., and Gregory, W. (1979). Exotic germplasm of *Arachis* L. Interspecific hybrids. *Journal of Heredity*, 70(3): 185–193.
- Halward, T., Stalker, T., LaRue, E., and Kochert, G. (1992). Use of single-primer dna amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Molecular Biology*, 18(2): 315–325.
- He, G., and Prakash, C. S. (1997). Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 97(2): 143-149.
- Holbrook, C. C., Brenneman, T. B., Stalker, H. T., Johnson, W. C., Ozias-Akins, P., Chu, Y., Vellidis, G., and McClusky, D. (2014). Peanut. Yield Gains in Major US Field Crops, *yieldgainsinmaj*, 173–194.
- Holbrook, C. C., Burow, M. D., Chen, C. Y., Pandey, M. K., Liu, L., Chagoya, J. C., Chu, Y., and Ozias-Akins, P. (2016). Recent advances in peanut breeding and genetics. In *Peanuts* (pp. 111–145). Elsevier.
- Holbrook, C. C., and Culbreath, A. K. (2007). Registration of ‘tifrunner’ peanut. *Journal of Plant Registrations*, 1(2): 124–124.
- Holbrook, C. C., and Stalker, H. T. (2003). Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews*, 22, 297–356.

- Hopkins, M. S., Casa, A. M., Wang, T., Mitchell, S. E., Dean, R. E., Kochert, G. D., and Kresovich, S. (1999). Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop science*, 39(4): 1243-1247.
- Hufford, M. B., Berny Mier y Teran, J. C., and Gepts, P. (2019). Crop biodiversity: an unfinished magnum opus of nature. *Annual review of plant biology*, 70, 727-751.
- Husted, L. (1936). Cytological studies an the peanut, *Arachis*. II. *Cytologia*, 7(3): 396–423.
- Isleib, T., Holbrook, C., and Gorbet, D. (2001). Use of plant introductions in peanut cultivar development. *Peanut Science*, 28(2): 96–113.
- Jarvis, A., Ferguson, M. E., Williams, D. E., Guarino, L., Jones, P. G., Stalker, H. T., Valls, J. F., Pittman, R. N., Simpson, C. E., and Bramel, P. (2003). Biogeography of wild *Arachis*. *Crop Science*, 43(3): 1100–1108.
- Kochert, G., Halward, T., Branch, W. D., and Simpson, C. E. (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied genetics*, 81(5): 565-570.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. R., and Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (*Leguminosae*). *American Journal of Botany*, 83(10): 1282–1291.
- Kordrostami, M., and Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: concepts and applications. *Genetics in The 3rd Millennium*, 13, 4024-4031.
- Korte, A., and Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods*, 9(1): 1-9.
- Krapovickas, A., Vanni, R. O., Pietrarelli, J. R., and Simpson, C. E. (2013). Las razas de maní de Perú. *Bonplandia*, 19-90.
- Krapovickas, A., Vanni, R. O., Pietrarelli, J. R., Williams, D. E., and Simpson, C. E. (2009). Las razas de maní de Bolivia. *Bonplandia*, 95-189.
- Krapovickas, A., Gregory, W. C., Williams, D. E., and Simpson, C. E. (2007). Taxonomy of the genus *Arachis* (*Leguminosae*). *Bonplandia*, 16, 7–205.
- Krapovickas, A. (2004). Consideraciones prehistóricas sobre el origen del maní cultivado. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, 320–331
- Krapovickas, A., and Gregory, W. (1994). Taxonomía del género. *Arachis* (*Leguminosae*), 1–186.
- Krapovickas, A., and Rigoni, V. A. (1960). The nomenclature of the subspecies and varieties of *A. hypogaea* L. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 14, 198-228.
- Kumari, V., Gowda, M., Tasiwal, V., Pandey, M. K., Bhat, R. S., Mallikarjuna, N., Upadhyaya, H. D., and Varshney, R. K. (2014). Diversification of primary gene pool through introgression of resistance to foliar diseases from synthetic amphidiploids to cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Crop Journal*, 2(2-3): 110–119.
- Leal-Bertioli, S. C., Godoy, I. J., Santos, J. F., Doyle, J. J., Guimarães, P. M., Abernathy, B. L., ... and Bertioli, D. J. (2018). Segmental allopolyploidy in action: increasing diversity through polyploid hybridization and homoeologous recombination. *American journal of botany*, 105(6): 1053-1066.
- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., and Araujo, A. C. G. (2017). Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. *American Journal of Botany*, 104(3): 379–388.

- Leal-Bertioli, S. C., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araujo, A. C., Silva, J. P., Cavalcante, U., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M., and others. (2015). *Arachis batizocoi*: A study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*, 115(2): 237–249.
- Mallikarjuna, N., Jadhav, D. R., Reddy, K., Husain, F., and Das, K. (2012). Screening new *Arachis* amphidiploids, and autotetraploids for resistance to late leaf spot by detached leaf technique. *European Journal of Plant Pathology*, 132(1): 17–21.
- Mallikarjuna, N., Senthilvel, S., and Hoisington, D. (2011). Development of new sources of tetraploid *Arachis* to broaden the genetic base of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(6): 889–907.
- Mallikarjuna, N., and Varshney, R. K. (2014). *Genetics, genomics and breeding of peanuts*. CRC Press.
- March, G., and Marinelli, A. D. (2005). Diseases and productive system (In Spanish). In B. Impresores (Ed.), *Enfermedades de maní en argentina* (pp. 1–11).
- Marinelli, A. D., March, G., and Rago, A. M. (1995). Peanut smut (*Thecaphora frezii*) on *Arachis hypogaea* L. (In Spanish). 7° Congreso de Micología Y 17° Jornadas Argentinas de Micología, 134.
- Marraro Acuña, F., Cosa, M., and Wiemer, A. (2013). Carbón del maní: Histología, incidencia y severidad. 28° Jornada Nacional de maní. General Cabrera Córdoba, Argentina.
- Melchinger, A. E. (1990). Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant breeding*, 104(1): 1-19.
- Michelotto, M. D., De Godoy, I. J., Pirota, M. Z., Dos Santos, J. F., Finoto, E. L., and Favero, A. P. (2017). Resistance to thrips (*Enneothrips flavens*) in wild and amphidiploid *Arachis* species. *PloS One*, 12(5).
- Morell, M., Peakall, R., Appels, R., Preston, L., and Lloyd, H. (1995). DNA profiling techniques for plant variety identification. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35(6): 807–819.
- Moretzsohn, M. C., Gouvea, E. G., Inglis, P. W., Leal-Bertioli, S. C., Valls, J. F., and Bertioli, D. J. (2013). A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Annals of Botany*, 111(1): 113–126.
- Moss, J., Spielman, I., Burge, A., Singh, A., and Gibbons, R. (1981). Utilisation of wild *Arachis* species as a source of *Cercospora* leafspot resistance in groundnut breeding. *Perspectives in Cytology and Genetics*.
- Ozias-Akins, P. (2013). The orphan legume genome whose time has come: Symposium highlights from the american peanut research and education society annual meeting. *Peanut Science*, 40(2): 66–69.
- Paredes, J., Cazón, L., Osella, A., Peralta, V., Alcalde, M., Kearney, M., Zusa, M., Rago, A., and Oddino, C. (2016). Relevamiento regional del carbón del maní y estimaciones de pérdidas producidas por la enfermedad. XXXI Jornada Nacional de maní. 14 de noviembre de 2014. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Paterson, A. H., Stalker, H. T., Gallo-Meagher, M., Burrow, M. D., Dwivedi, S. L., Crouch, J. H., and Mace, E. S. (2004). Genomics and genetic enhancement of peanut. *Legume Crop Genomics*, 97-109.

- Pozzi, F. I., Etchart, V., Díaz, D., Royo, O. M., Díaz, C., Moreno, M. V., and Giéco, J. O. (2014). Caracterización genética de germoplasma de maní cultivado (*Arachis hypogaea* L.) mediante el empleo de marcadores microsatélites. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(2): 1–13.
- Rago, A. M., Cazon, L. I., Paredes, J. A., Molina, J. P. E., Conforto, E. C., Bisonard, E. M., and Oddino, C. (2017). Peanut smut: From an emerging disease to an actual threat to argentine peanut production. *Plant Disease*, 101(3): 400–408.
- Ramos, M. L., Fleming, G., Chu, Y., Akiyama, Y., Gallo, M., and Ozias-Akins, P. (2006). Chromosomal and phylogenetic context for conglutin genes in *Arachis* based on genomic sequence. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(6): 578–592.
- Ré, F. 2019. Argentina. En: AgroVoz, Córdoba, Argentina, Octubre 05, <http://agrovoz.lavoz.com.ar/agricultura/primer-maní-resistente-al-carbon-ya-tiene-aval-oficial>.
- Ren, X., Jiang, H., Yan, Z., Chen, Y., Zhou, X., Huang, L., Lei, Y., Huang, J., Yan, L., Qi, Y., and others. (2014). Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in china by ssr markers. *PloS One*, 9(2).
- Robledo, G., Lavia, G., and Seijo, G. (2009). Species relations among wild *Arachis* species with the a genome as revealed by fish mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(7): 1295–1307.
- Robledo, G., and Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on fish mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(6): 1033–1046.
- Samoluk, S. S., Chalup, L., Robledo, G., and Seijo, J. G. (2015). Genome sizes in diploid and allopolyploid *Arachis* L. species (section *Arachis*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(5): 747-763.
- Santana, S. H., and Valls, J. F. (2015). *Arachis veigae* (*Fabaceae*), the most dispersed wild species of the genus, and yet taxonomically overlooked. *Bonplandia*, 24(2): 139-150.
- Sánchez, R., Baldessari, J., and Royo, O. (2010). Catálogo 2010 de los recursos genéticos del maní. Córdoba, AR. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Seijo, J.G., G.I. Lavia, A. Fernández, A. Krapovickas, D. Ducasse, D. J. Bertioli. and E.A. Moscone. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* - *Leguminosae*) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany* 94: 1963-1971.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., and Moscone, E. A. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by fish as evidence that *Arachis duranensis* and *a. Ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (*Leguminosae*). *American Journal of Botany*, 91(9): 1294–1303.
- Settaluri, V., Kandala, C., Puppala, N., and Sundaram, J. (2012). Peanuts and their nutritional aspects—a review. *Food and Nutrition Sciences* 03(12):1644-1650.
- Shirasawa, K., Bertioli, D. J., Varshney, R. K., Moretzsohn, M. C., Leal-Bertioli, S. C., Thudi, M., Pandey, M. K., Rami, J.-F., Foncéka, D., Gowda, M. V., and others. (2013). Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the a and b genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. *DNA Research*, 20(2): 173–184.

- Simpson, C. (2001). Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* L. *Peanut Science*, 28(2): 114–116.
- Singh, U., Singh, B., and Smith, O. (1991). Effect of varieties and processing methods on phytic acid and protein digestibility of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 28(6): 345–347.
- Soave, J. H., Buteler, M. I., Oddino, C., Soave, S. J., Moresi, A., and Bianco, C. (2003). Mejoramiento Genético Del maní En Argentina. INTA. <https://inta.gob.ar/documentos/mejoramiento-genetico-del-maní-en-argentina-historia-y-situacion-actual>
- Stalker, H. (1997). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3): 205–217.
- Stalker, H., and Lynch, R. (2002). Registration of four insect-resistant peanut germplasm lines.(Registrations of germplasm). *Crop Science*, 42(1): 313–315.
- Stalker, H. T., and Mozingo, L. G. (2001). Molecular markers of *Arachis* and marker-assisted selection. *Peanut Science*, 28(2): 117-123.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57(3): 1102–1120.
- Stalker, H., and Wynne, J. (1979). Cytology of interspecific hybrids in section *Arachis* of peanuts. *Peanut Science*, 6(2): 110–114.
- Statistical database FAOSTAT. FAO, Rome. <http://faostat3.fao.org> (accessed 25 Jun. 2020).
- Tallury, S., Isleib, T., Copeland, S., Rosas-Anderson, P., Balota, M., Singh, D., and Stalker, H. (2014). Registration of two multiple disease-resistant peanut germplasm lines derived from *Arachis cardenasii* krapov. and WC gregory, gkp 10017. *Journal of Plant Registrations*, 8(1): 86–89.
- Turcotte, M. M., Araki, H., Karp, D. S., Poveda, K., and Whitehead, S. R. (2017). The eco-evolutionary impacts of domestication and agricultural practices on wild species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712): 20160033.
- Valls, J. F., and Simpson, C. E. (2017). A new species of *Arachis* (*Fabaceae*) from Mato Grosso, Brazil, related to *Arachis matiensis*. *Bonplandia*, 26(2): 143-150.
- Valls, J. F., and Simpson, C. E. (2005). New species of *Arachis* (*Leguminosae*) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, 35–63.
- Walter K Sand Gillett HJ, (1997) Red List of Threatened Plants–Compiled by the World Conservation Monitoring Centre.
- Williams, D. E. (1991). Peanuts and peanut farmers of the Rio Beni: traditional crop genetic resource management in the Bolivian Amazon. PhD Thesis. City University of New York, New York (USA). 170 pp.
- Williams, D. (2001). New directions for collecting and conserving peanut genetic diversity. *Peanut Science*, 28(2): 135–140.
- Wynne, J. C., Haiward, T., and Knauft, D. A. (1989). Cytogenetics and genetics of *Arachis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 8(3): 189–220.
- Zhuang, W., Chen, H., Yang, M., Wang, J., Pandey, M. K., Zhang, C. and Garg, V. (2019). The genome of cultivated peanut provides insight into legume karyotypes, polyploid evolution and crop domestication. *Nature genetics*, 51(5): 865-876.
- Zhou, X., Xia, Y., Ren, X., Chen, Y., Huang, L., Huang, S. and Jiang, H. (2014). Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large

scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). BMC genomics, 15(1): 351.

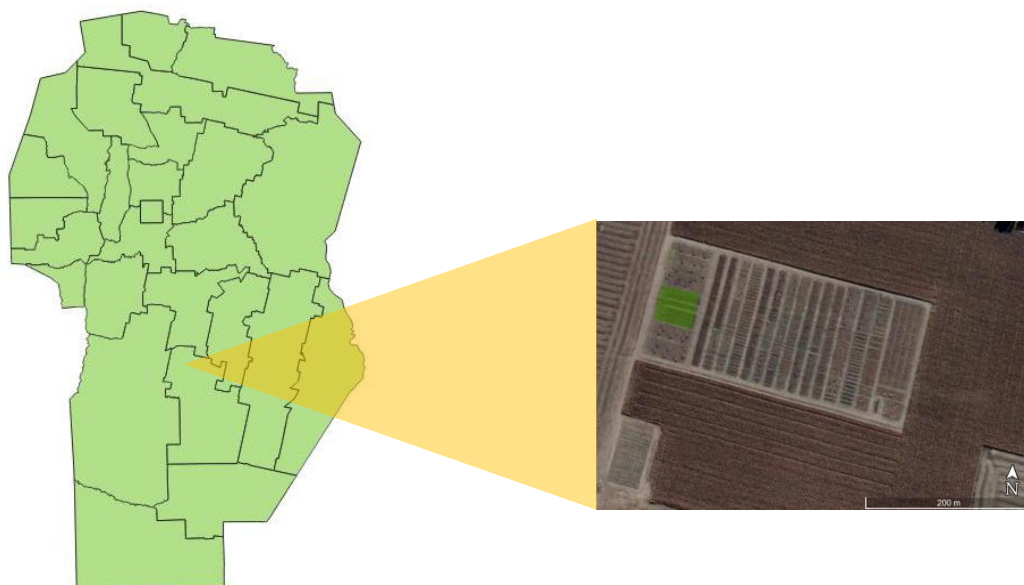
## CAPÍTULO II

### ORIGEN Y DESARROLLO DEL MATERIAL VEGETAL

En este capítulo se describe el desarrollo del material vegetal que se utilizó en el presente trabajo de tesis. En este proceso que comenzó casi una década antes del inicio del plan de Tesis, el autor estuvo involucrado desde el año 2014.

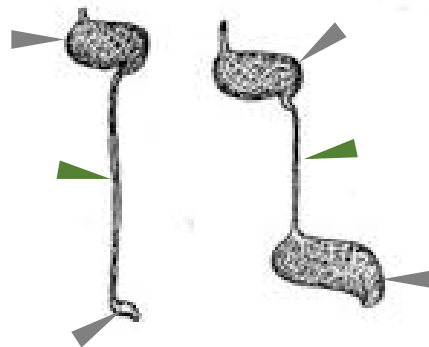
#### Identificación de especies silvestres resistentes

La búsqueda de materiales resistentes incluyó la evaluación de ocho especies silvestres del género *Arachis* para la resistencia a carbón del maní utilizando la variedad comercial “Tegua” (*A. hypogaea*) como control susceptible (ver Tabla 2.1). Los materiales incluyeron materiales de distintos grupos genómicos (A, B y K) y con diferentes niveles de ploidía (2x y 4x) y ciclos de vida (anuales y perennes). Se realizaron ensayos a campo sembrando cada accesión en dos parcelas de 5×1 m. Los ensayos experimentales se llevaron adelante en el campo experimental de “Criadero El Carmen” en General Cabrera, Córdoba, Argentina (32°49’46“S, 63°52’12”W) durante tres ciclos agrícolas (2003-2005) (Figura 2.1).



**Fig. 2.1** Mapa de la provincia de Córdoba con el detalle de la ubicación de la parcela experimental del Criadero El Carmen. El mapa se obtuvo con el software QGIS versión 3.16.1-Hannover utilizando las capas de mapa base de Córdoba obtenido del sitio web <https://idecor.cba.gov.ar/> y la imagen satelital fue generada con Google Earth Pro 7.3.3.7786 (64-bit). En verde se destaca la ubicación del infectario dentro del campo experimental.

El área donde se realizaron los ensayos experimentales tiene un registro histórico de carbón del maní con un promedio de  $1,5 \times 10^3$  teliosporas  $g^{-1}$  de suelo. Los frutos y las semillas de las especies silvestres fueron evaluadas para carbón del maní, usando muestras de 100 artejos de frutos por parcela en cada temporada durante los tres años de ensayos. Cada fruto de las especies silvestres normalmente forma dos semillas que quedan separadas por un istmo delgado (ver Figura 2.2) que al madurar se quiebra y genera dos artejos uniseminados. Los artejos fueron abiertos manualmente e inspeccionados para evaluar la presencia de semillas carbonosas.



**Fig. 2.2** Esquema de frutos típicos de las especies silvestres de *Arachis* con los artejos señalados con flechas grises e istmos en verde. Adaptado de Krapovickas y Rigoni, 1957.

Este análisis mostró que ninguno de los materiales silvestres presentó síntomas de infección de carbón de maní en los tres años de observaciones. Por lo tanto, todas las accesiones de especies silvestres diploides con genoma A (*A. cardenasii*, *A. correntina* y *A. villosa*), B (*A. magna* y *A. ipaënsis*) y K (*A. batizocoi*) y el tetraploide silvestre con genoma AABB (*A. monticola*) evaluadas fueron considerados resistentes al carbón del



maní. La resistencia en las especies silvestres fue observada independientemente del ciclo de vida y nivel de ploidía (ver Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Especies, accesiones, nivel de ploidía, genoma y ciclo de vida de los materiales usados para la evaluación de resistencia al carbón del maní durante los años 2003 a 2005. <sup>a</sup>Designación del genoma según Robledo *et al.*, 2009 y Robledo y Seijo, 2010; <sup>b</sup>A: anual; P: perenne.

Espece	Accesión	Ploidía (x)	Genoma <sup>a</sup>	Ciclo de vida <sup>b</sup>
<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C. Greg.	K 9484	2	K	A
<i>A. cardenasii</i> Krapov. & W.C. Greg.	KSSc 36015	2	A	P
<i>A. correntina</i> (Burkart) Krapov. & W.C. Greg.	K 11905	2	A	P
<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Greg.	K 8010	2	A	A
<i>A. hypogaea</i> L.	var. Tegua	4	AB	A
<i>A. ipaënsis</i> Krapov. & W.C. Greg.	GKPSBSc 30076	2	B	A
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Greg. & C. E. Simpson	KGSSc 30097	2	A	A
<i>A. monticola</i> Krapov. & Rigoni	S.J. 99004	4	AB	A
<i>A. villosa</i> Benth.	Seijo & Solís Neffa 2869	2	A	P

<sup>a</sup>Designación del genoma según Robledo *et al.*, 2009 y Robledo & Seijo, 2010; <sup>b</sup>A: anual; P: perenne.

Las especies silvestres son una fuente de genes para desarrollar cultivares mejorados con resistencia a plagas y enfermedades (Sharma *et al.*, 2013; Oddino *et al.*, 2017; Stalker, 2017). El hecho de que la resistencia al carbón del maní fue identificada en especies silvestres con genomas y ciclos de vida diferentes, provee adicionalmente la oportunidad para piramidizar genes de resistencia en los genomas A y B del maní cultivado.

La resistencia a carbón observada en *A. monticola* (AABB) es de interés significativo dado que es una especie naturalmente compatible en cruzamientos con *A. hypogaea*, dado su nivel de ploidía y constitución genómica coincidente. El descubrimiento de diversas fuentes de resistencia en especies silvestres es relevante para el mejoramiento de la resistencia al carbón del maní, ya que está emergiendo la preocupación sobre la posible variabilidad genética presente en *T. frezii* (Rago *et al.*, 2017), un hecho que reduciría la durabilidad de la resistencia desde una fuente única.

## **Hibridación interespecífica, obtención de un híbrido anfidiplóide**

Con el fin de generar un material derivado de especies silvestres que presente diferentes fuentes de resistencia al carbón y que sea compatible con *A. hypogaea* se desarrolló un híbrido interespecífico complejo utilizando tres especies diploides (Torres *et al.*, 2012). Para la obtención del primer híbrido, se usaron tres individuos de *A. cardenasii* Krapov. & W.C. Greg (KSSc 36015) como progenitores maternos y un individuo de *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Greg (K 11905) como donante de polen en los cruzamientos. Se polinizaron un total de 21 flores; de las cuáles se obtuvieron cuatro semillas híbridas. Dos de esas cuatro semillas, fueron sembradas en noviembre de 2005 y en febrero de 2006 se obtuvieron dos plantas híbridas. Para la obtención del trihíbrido, se polinizaron 28 flores de las plantas híbridas mencionadas utilizando a *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Greg (K 9484) como progenitor masculino. El resultado de la segunda hibridación fueron cuatro semillas F<sub>1</sub>.

Todos los cruzamientos se llevaron a cabo según las descripciones de Simpson, (2001). Las plantas híbridas fueron identificadas por la formación de masas agregadas de polen en las anteras y la ausencia de producción de clavos (Gegory y Gregory, 1979; Krapovickas *et al.*, 1994).

Para la duplicación cromosómica del trihíbrido, las cuatro semillas F<sub>1</sub> fueron germinadas *in vitro* y tratadas con colchicina según lo describe Torres *et al.*, (2012). El anfidiplóide obtenido [*(A. cardenasii* × *A. correntina*) × *A. batizocoi*]<sup>4x</sup> recuperó la fertilidad parcialmente luego de la duplicación cromosómica como se ha informado en otros híbridos complejos de *Arachis* obtenidos a través de la hibridación de especies silvestres del género con diferentes genomas (Simpson *et al.*, 1991; Fávero *et al.*, 2015). La evaluación a campo de un promedio de siete plantas del anfidiplóide obtenido, durante tres años y con la misma presión de inóculo que los parentales silvestres mostró que era un genotipo resistente al carbón del maní.

## **Desarrollo de una población de líneas recombinantes endocriadas (RILs)**

En febrero de 2010 se realizaron 33 cruzamientos entre el anfidiplóide sintético (donante de polen) y una línea comercial de *A. hypogaea* alto oleico (AO) susceptible al

carbón del maní con el código de accesión 17304-7-B (receptora de polen). Este material cultivado será mencionado de aquí en adelante como progenitor cultivado. Las cinco semillas  $F_1$  obtenidas se sembraron en macetas individuales a partir de las cuales se obtuvieron 93, 115, 123, 62, y 60 semillas  $F_2$ , totalizando 453 semillas.

El desarrollo de la población interespecífica de RILs por descendencia de semilla individual comenzó desde la generación  $F_2$ . Con este propósito, las plantas fueron cosechadas manualmente y la progenie fue sembrada en las subsecuentes campañas en surcos individuales para producir las siguientes generaciones hasta alcanzar las generaciones  $F_{7-9}$ . Parte de las líneas se perdieron porque produjeron semillas no viables o no produjeron semillas, lo que redujo significativamente la población. En la generación  $F_6$  la población quedó compuesta por 89 RILs fértiles. Luego, algunas de estas líneas fueron purificadas por su aspecto fenotípico y, con los materiales con fenotipos diferentes se constituyeron nuevas RILs (Ver Tabla 2.2). Con un total de 103 RILs se avanzó hasta la generación  $F_9$ .

**Tabla 2.2** División de las líneas endocriadas (RILs) a partir de la generación  $F_7$  por segregación fenotípica morfológica

RIL original	División
R44	R44A
R47	R47A
R50	R50A
R50	R50B <sup>a</sup>
R52	R52A
R56	R56A
R59	R59A
R64	R64A
R72	R72A
R73	R73A
R78	R78A
R94	R94B
R95	R95A
R98	R98A

<sup>a</sup>Originalmente dividida en 50A y 50B. La RIL 50A se perdió

La drástica reducción del número de líneas endocriadas desde F<sub>2</sub> a F<sub>5</sub>, debido a la producción de semillas no viables, sugirió que la recombinación en estas generaciones iniciales produjo gametos con cromosomas o genes desbalanceados que comprometieron la supervivencia de la generación siguiente. Este fenómeno puede contextualizarse en la clásica disgenesia genética que ocurre como una barrera post-cigótica en numerosos grupos de plantas (Grant, 1981) entre ellos *Arachis* (Simpson, 1991). Además, numerosos mecanismos moleculares de interacción genómica en híbridos han sido descritos como desencadenantes de inestabilidad genómica y fenotípica que pueden conducir a la baja viabilidad o fertilidad de los mismos (Madlung *et al.*, 2005). A pesar de estas barreras, la producción abundante de semillas durante varias generaciones en las restantes 103 líneas sugiere que los procesos que se producen durante la interacción genómica pudieron estabilizarse y de este modo generar progenie viable y fértil.

Por otro lado, las cinco semillas F<sub>1</sub> obtenidas luego del cruzamiento del anfidiplóide AAKK con el maní cultivado sugiere la ocurrencia de apareamiento homeólogo entre genomas B y K. Es decir, la recombinación se habría dado entre los cromosomas del genoma A del maní cultivado con aquellos del mismo subgenoma en el anfidiplóide, y entre los del subgenoma B del progenitor cultivado con los del genoma K del anfidiplóide según lo sugerido por Leal-Bertioli *et al.*, (2015). Este fenómeno es significativo para el mejoramiento del maní ya que permite utilizar la variabilidad genética presente en las especies de genoma K, para proveer genes de interés al maní (Simpson *et al.*, 1993; Simpson and Starr, 2001; Burow *et al.*, 2001; Fávero *et al.*, 2015).

## BIBLIOGRAFÍA

- Bertioli, D. J., Seijo, G., Freitas, F. O., Valls, J. F., Leal-Bertioli, S. C., and Moretzsohn, M. C. (2011). An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources*, 9(1): 134–149.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., Starr, J. L., and Paterson, A. H. (2001). Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics*, 159(2): 823–837.
- de Blas, F. J., Bressano, M., Teich, I., Balzarini, M. G., Arias, R. S., Manifesto, M. M., Costero, B. P., Oddino, C., Soave, S. J., Soave, J. A., and others. (2019). Identification of smut resistance in wild *Arachis* species and its introgression into peanut elite lines. *Crop Science*, 59(4): 1657–1665.
- Dwivedi, S. L., Bertioli, D. J., Crouch, J. H., Valls, J. F., Upadhyaya, H. D., Fávero, A., ... and Paterson, A. H. (2007). Peanut. In *Oilseeds* (pp. 115-151). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fávero, A. P., Santos, R. F. D., Simpson, C. E., Valls, J. F. M., and Vello, N. A. (2015). Successful crosses between fungal-resistant wild species of *Arachis* (section *Arachis*) and *Arachis hypogaea*. *Genetics and Molecular Biology*, 38(3): 353-365.
- Fonceka, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoeye, O., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2012). Fostered and left behind alleles in peanut: Interspecific qtl mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biology*, 12(1): 26.
- Foncéka, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M. N., Ndoeye, O., Fávero, A. P., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2009). Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: A way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. *BMC Plant Biology*, 9(1): 103.
- García, G., Stalker, H., and Kochert, G. (1995). Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome*, 38(1): 166–176.
- Gregory, M. P., and Gregory, W. (1979). Exotic germplasm of *Arachis* L. Interspecific hybrids. *Journal of Heredity*, 70(3): 185–193.
- Jarvis, A., Ferguson, M. E., Williams, D. E., Guarino, L., Jones, P. G., Stalker, H. T., Valls, J. F., Pittman, R. N., Simpson, C. E., and Bramel, P. (2003). Biogeography of wild *Arachis*. *Crop Science*, 43(3): 1100–1108.
- Krapovickas, A., and Gregory, W. (1994). Taxonomía del género. *Arachis (Leguminosae)*, 1–186.
- Kumari, V., Gowda, M., Tasiwal, V., Pandey, M. K., Bhat, R. S., Mallikarjuna, N., Upadhyaya, H. D., and Varshney, R. K. (2014). Diversification of primary gene pool through introgression of resistance to foliar diseases from synthetic amphidiploids to cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Crop Journal*, 2(2-3): 110–119.
- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., and Araujo, A. C. G. (2017). Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. *American Journal of Botany*, 104(3): 379–388.

- Leal-Bertioli, S. C., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araujo, A. C., ... and Carrasquilla-Garcia, N. (2015). *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*, *115*(2): 237-249.
- Leal-Bertioli, S. C., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araujo, A. C., Silva, J. P., Cavalcante, U., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M., and others. (2015). *Arachis batizocoi*: A study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*, *115*(2): 237-249.
- Rago, A. M., Cazon, L. I., Paredes, J. A., Molina, J. P. E., Conforto, E. C., Bisonard, E. M., and Oddino, C. (2017). Peanut smut: From an emerging disease to an actual threat to argentine peanut production. *Plant Disease*, *101*(3): 400-408.
- Robledo, G., Lavia, G. I., & Seijo, G. (2009). Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, *118*(7), 1295-1307.
- Robledo, G., and Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on fish mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(6): 1033-1046.
- Sharma, S., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., and Gowda, C. L. L. (2013). Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 309.
- Simpson, C. (2001). Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* L. *Peanut Science*, *28*(2): 114-116.
- Simpson, C. E., Nelson, S. C., Starr, J. L., Woodard, K. E., and Smith, O. D. (1993). Registration of TxAG-6 and TxAG-7 peanut germplasm lines. *Crop Science*, *33*(6): 1418-1418.
- Simpson, C. E. (1991). Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science*, *18*(1): 22-26.
- Soave, J. H., Buteler, M. I., Soave, S., Bima, P., Faustinelli, P., Moresi, A., and Bianco, C. (2011). Población obtenida por cruzamiento de especies silvestres y duplicación de cromosomas para introgresión de genes en maní. Jornada Nacional de Maní. 26. 2011 09 15, 15 de septiembre de 2011. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, *57*(3): 1102-1120.
- Torres, L., P. Bima, B. Costero, A. Ordoñez, C. Turina, C. Martino, *et al.* (2012). Anfiploide sintético desarrollado para ampliar la base genética del maní cultivado (*Arachis hypogaea*). *Cienc. Tecnol. Cultivos Industriales. Maní*. *3*:236-242.

## CAPÍTULO III

# CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL CARBÓN DEL MANÍ

## INTRODUCCIÓN

La caracterización morfológica es usada para interpretar la variabilidad genética en las colecciones de germoplasma o en una población determinada (Carvalho y Quesenberry, 2009; Hancock *et al.*, 2019). Cuando se trabaja con especies silvestres de un género de interés para introgresar genes a la especie cultivada, la primera aproximación al conocimiento de los atributos genéticos que presentan los potenciales progenitores silvestres y las poblaciones generadas por estos, se obtiene a partir de los análisis fenotípicos. En general, los estudios morfológicos no incluyen equipamiento sofisticado o procedimientos laboriosos y los métodos para evaluar estos caracteres son simples y poco costosos (Hawkes *et al.*, 2012). Asimismo, las mejoras en la capacidad de cómputo y en los métodos estadísticos han facilitado la evaluación de caracteres morfológicos de múltiples caracteres heredados de manera cuantitativa mediante el análisis de grandes bases de datos (Carvalho y Quesenberry, 2009). La información generada mediante la caracterización morfológica es valiosa para identificar accesiones individuales basadas en un conjunto particular de caracteres fenotípicos o para seleccionar un único carácter en múltiples accesiones. El conjunto de datos generados, también puede ser útil para estimar la diversidad fenética de una colección de germoplasma o población de estudio, para establecer el tamaño ideal de la colección de germoplasma a evaluar para un determinado carácter o la utilidad potencial que pueda presentar una población dada para un proceso de mejoramiento en particular.

El análisis morfológico también permite identificar grupos fenéticos de accesiones o individuos de una población o colección de germoplasma de mayor tamaño. En el caso de los bancos de germoplasma el agrupamiento fenético de las accesiones permite la organización del material y la creación de colecciones núcleo, siendo un proceso especialmente importante en bancos de germoplasma con gran número de accesiones

(Upadhyaya *et al.*, 2003) para desarrollar evaluaciones intensivas de los materiales. Asimismo, el agrupamiento permite conocer el grado de polimorfismo en las poblaciones y sus posibles correlaciones con caracteres particulares en estudio (Upadhyaya *et al.*, 2003; Holbrook y Dong, 2005).

Numerosas técnicas estadísticas pueden usarse para evaluar la divergencia fenética. Sin embargo, cuando el número de individuos y el número de caracteres a analizar es grande, los análisis multivariados son los más apropiados (Carvalho y Quesenberry, 2009). Estos ofrecen la ventaja de poder discriminar grupos de genotipos considerando múltiples variables al mismo tiempo. Dentro de las técnicas multivariadas disponibles para realizar estudios fenéticos, las más usadas son el análisis de componentes principales (ACP) y de clústeres jerárquicos (Hawkes *et al.*, 2012; López-Santiago *et al.*, 2008). Estos análisis se han usado ampliamente en las investigaciones relacionadas con la caracterización de los recursos genéticos y desarrollo de colecciones múltiples (Upadhyaya *et al.*, 2003). Mediante el ACP se obtiene un conjunto de nuevas variables, que se generan como combinación lineal de los datos originales. Tales variables tienen la característica de no estar correlacionadas y resultan óptimas para señalar estructuras entre los genotipos de la población de estudio. La técnica permite la cuantificación de la divergencia fenética y excluir variables no discriminantes ya que dos componentes altamente correlacionados son mejor explicados como un único factor (Abdi *et al.*, 2010). Asimismo, los análisis multivariados permiten calcular un índice de similaridad con el propósito de agrupar individuos o accesiones y cuantificar la divergencia fenética de una población o accesiones de germoplasma.

La comunidad científico-tecnológica del maní ha recurrido a la creación de poblaciones experimentales para la introgresión de genes desde las especies silvestres de *Arachis* ya que presentan elevada variabilidad genética interespecífica (Burow *et al.*, 2001; Foncéka *et al.*, 2009; Fonceka *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2014; Leal-Bertioli *et al.*, 2017; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Simpson, 2001; Simpson *et al.*, 2003; Simpson y Starr, 2001; Starr *et al.*, 1990). La generación de información básica sobre las características fenotípicas del germoplasma disponible y de las poblaciones derivadas a partir de este material es de fundamental importancia para la caracterización de los mismos y para el aprovechamiento de estos recursos genéticos en el mejoramiento del maní cultivado.



Por ello, en este capítulo se aborda un análisis morfológico de una población de 103 RILs y sus progenitores con el fin de caracterizar fenotípicamente la población de estudio, analizar la variabilidad existente para los caracteres analizadas y la correlación existente entre los mismos. Asimismo, se evalúa la resistencia al carbón que presentan las diferentes líneas de la población para establecer los patrones de segregación, analizar las posibles correlaciones entre los caracteres morfológicos y obtener una caracterización precisa de la resistencia en la población para los análisis genéticos que se realizan en el capítulo IV.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Caracterización morfológica**

Para evaluar la morfología externa de la población de 103 RILs y sus progenitores, se seleccionó una planta al azar de cada parcela y fue herborizada en cada año de evaluación, de esta manera cada genotipo estuvo representado por tres repeticiones. Las mediciones macro-exomorfológicas, correspondientes a las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide, se realizaron sobre material original depositado en el herbario CTES del IBONE. Las RILs se plantaron durante tres años en un diseño experimental de tres bloques completos aleatorizados en el área experimental del Criadero El Carmen, desde 2015 a 2017. Cada parcela estuvo representada por cada uno de los genotipos a evaluar. La unidad experimental (parcela) estuvo compuesta de 25 plantas de cada RIL sembrada en surcos de 2,5 m. La evaluación morfométrica se realizó sobre las generaciones  $F_7:F_9$ . En cada genotipo se evaluaron 13 caracteres en el campo y 26 mediciones en laboratorio (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Caracteres morfológicos estudiados la población interespecífica de 103 RILs, los progenitores de la población (*A. hypogaea* y anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide.

Caracter	Abreviación	Tipo de variable	Unidad de medida	Instrumento de medición
Largo del folíolo en la rama lateral	L_F_RL	Cuantitativa	mm	Calibre
Ancho del folíolo en la rama lateral	A_F_RL	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo del raquis en la rama lateral	L_R_RL	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo del pecíolo en la rama lateral	L_P_RL	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo de folíolo en el eje central	L_F_EC	Cuantitativa	mm	Calibre
Ancho de folíolo en el eje central	A_F_EC	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo del raquis en el eje central	L_R_EC	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo del pecíolo en el eje central	L_P_EC	Cuantitativa	mm	Calibre
Largo de la vaina	L_V	Cuantitativa	mm	Calibre
Ancho de la vaina	A_V	Cuantitativa	mm	Calibre
Profundidad de la vaina	P_V	Cuantitativa	mm	Calibre
Constricción de la vaina	Constr	Cualitativa	1 = sin constricción a 5 = constricción completa	Escala visual
Reticulado exocarpo	Ret	Cualitativa	1 = reticulado inaparente a 5 = reticulado muy aparente	Escala visual
Costillas exocarpo	Cost	Cualitativa	1 = costillas inaparentes a 5 = costillas muy aparentes	Escala visual
Pico del fruto	Pico	Cualitativa	1 = pico inaparente a 5 = pico muy marcado	Escala visual
Número de semillas <frecuencia	Sem1	Cuantitativa	unidad	Conteo
Número de semillas <frecuencia	Sem2	Cuantitativa	unidad	Conteo
Número de semillas <frecuencia	Sem3	Cuantitativa	unidad	Conteo
Número de semillas promedio	Sem_prom	Cuantitativa	unidad	Conteo

**Tabla 3.1** Continuación

<b>Caracter</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Instrumento de medición</b>
Largo de semilla	L_S	Cuantitativa	mm	Calibre
Ancho de semilla	A_S	Cuantitativa	mm	Calibre
Profundidad de semilla	P_S	Cuantitativa	mm	Calibre
Color de testa	Color_testa	Cualitativa	1 = blanco a 4 = colorado	Escala visual
Textura de semilla	Textura_semilla	Cualitativa	1 = suave a 5 = rugoso	Escala visual
Forma de semilla	Forma_semilla	Cualitativa	1 = alargada a 4 = redondo	Escala visual
Peso en gr de 25 semillas	gr_25_semillas	Cuantitativa	gr	Balanza analítica
Hábito de crecimiento	Hab_crec	Cualitativa	1 = procumbente I a 6 = erecto	Escala visual
Desarrollo planta	Desarrollo	Cualitativa	1 = pequeñas a 6 = muy desarrolladas	Escala visual
Aspecto de folíolos	Asp_foliolos	Cualitativa	1 = pequeños a 3 = similares a <i>A. hypogaea</i>	Escala visual
Color de la planta	Color_planta	Cualitativa	1 = verde claro a 3 = verde oscuro	Escala visual
Eje Central	Eje Central	Cualitativa	1 = inconspicuo a 3 = conspicuo	Escala visual
Estado planta <sup>a</sup>	Estado	Cualitativa	1 = inmadura a 5 = senescente	Escala visual
Adherencia de tierra al fruto	Adherencia_tierra	Cualitativa	1 = frutos sin tierra a 5 = frutos con mucha tierra	Escala visual
Color de fruto	Color_vaina	Cualitativa	1 = blancos a 4 = pardos	Escala visual
Distribución de la fructificación	Fructificación	Cualitativa	1 = fructificación concentrada a 5 = fructificación dispersa	Escala visual
Textura de la vaina	Textura_vaina	Cualitativa	1 = suave a 5 = rugosa	Escala visual
Resistencia al quiebre del fruto	Resistencia_vaina	Cualitativa	1 = débil a 4 = muy resistente	Escala visual
Espesor del exocarpo	Espesor_exocarpo	Cualitativa	1 = fina a 5 = gruesa	Escala visual
Madurez frutos	Madurez	Cualitativa	1 = inmaduros a 5 = maduros	Escala visual <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Estado de planta indica el estado fenológico desde inmadura (en crecimiento) a senescente.

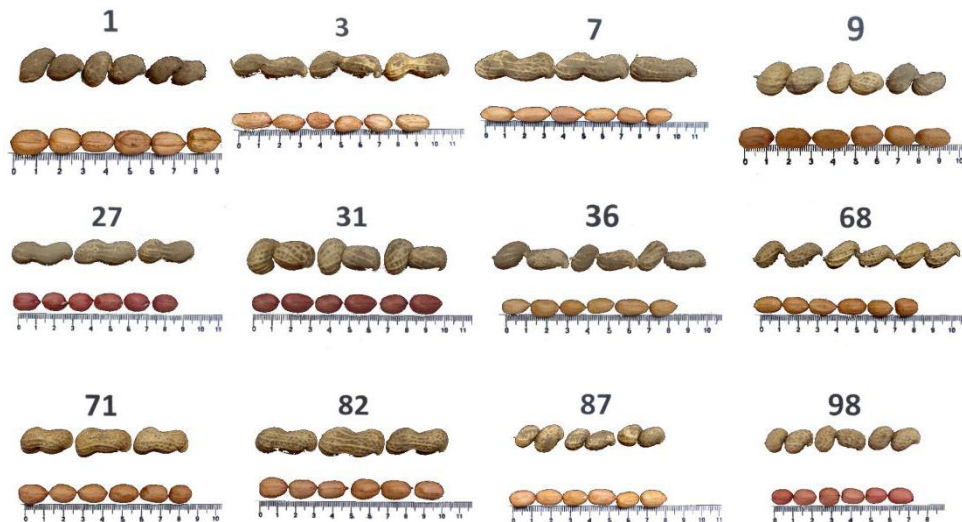
<sup>b</sup>Determinado por la coloración de la capa interior del exocarpo.

Para el registro de los caracteres morfológicos foliares, en cada año y cada repetición, se midió una hoja distal completamente desplegada de tres ramas laterales y de tres ejes centrales de cada genotipo herborizado al final del ciclo (Figura 3.1).



**Fig. 3.1** Ejemplar herborizado para la medición de caracteres cuantitativos, vegetativos y reproductivos.

Para los caracteres reproductivos, de cada año y de cada repetición, se midieron tres frutos y seis semillas al azar del conjunto de semillas cosechadas de cada genotipo. La figura 3.2 muestra la variabilidad de las vainas, coloración de la testa y forma de la semilla de las RILs.



**Fig. 3.2** Variabilidad de frutos y semillas en la población de 103 líneas recombinantes endocriadas derivadas del cruzamiento de un anfidiplóide y una línea experimental *A. hypogaea*. El número sobre los de frutos y semillas corresponde al número de RIL y la escala en la parte inferior de cada imagen muestra la variación de tamaño.

Las variables relacionadas con la estructura de la planta se midieron en las parcelas al final de ciclo, según la apariencia de todas las plantas de la parcela. La Figura 3.3 muestra la variabilidad de la estructura vegetativa de las RILs a campo.



**Figura 3.3** Plantas a campo representativas de la variabilidad de los caracteres vegetativos medidos en 103 RILs derivadas del cruzamiento de un anfidiplóide y una línea experimental *A. hypogaea*.

Las variables de tamaño fueron medidas con un calibre digital de 150 mm (Calibre Essex de acero inoxidable mod. 155934), y las variables categóricas se estimaron en función de las escalas anteriormente utilizadas (Royo, 1992; Royo *et al.*, 2017; Royo *et al.*, 2015; Seijo *et al.*, 2019; Nigam, 2014).

El promedio, el desvío estándar, el rango y el coeficiente de variación fueron calculados para todos los caracteres morfológicos. Los análisis subsiguientes incluyeron todas las variables excepto en número de semilla más frecuente de cada genotipo ya que se obtuvo una variable derivada de estas tres denominada número de semillas promedio. Las medias de los caracteres cuantitativos de cada genotipo se compararon usando el procedimiento de agrupamiento y comparación de medias denominado Scott and Knott ( $\alpha=0,05$ ) (Scott and Knott, 1974) mediante ANAVA mediante el paquete de R “ScottKnott” (Jelihovschi *et al.*, 2014). La diversidad fenotípica existente en los caracteres morfológicos evaluados en las RILs se estimó mediante el índice H de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon and Weaver, 1962) mediante la ecuación 3.1 utilizando el paquete de R “Vegan” (Oksanen *et al.*, 2007).

### Ecuación 3.1

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i \log_b p_i)$$

donde  $p_i$  es la proporción del total de morfotipos a partir del  $i$ -ésimo morfotipo y  $s$  es el número de morfotipos por lo que  $\sum_{i=1}^S p_i = 1$  y  $b$  es la base del logaritmo.

La matriz de datos fue analizada usando el software R (Team, 2019). Las correlaciones fenotípicas ( $\alpha = 0,05$ ) entre los caracteres morfológicos de la población interespecífica de RILs, se calcularon con el paquete “corrplot” de R (Wei *et al.*, 2017). Según lo sugerido por Skinner *et al.*, (1999) se consideraron como correlaciones con significado biológico las que tuvieron un valor absoluto superior a  $r \geq 0.71$ .

Las características cualitativas fueron transformadas a valores numéricos de escala (Nigam, 2014) (ver Tabla 3.1). Con la matriz de datos de todos los caracteres morfológicos,

se realizó un análisis de conglomerados a partir de una matriz de distancias euclídeas entre las RILs, sus progenitores y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide, utilizando el método de Ward para la construcción de los clústeres jerárquicos. Finalmente, con la misma matriz de datos se realizó un análisis de componentes principales. Los comandos utilizados en R se encuentran en el Anexo Script R

### **Evaluación fenotípica de la resistencia a carbón del maní**

Las evaluaciones fenotípicas para el carbón del maní se realizaron sobre el mismo ensayo de las mediciones morfológicas. El inóculo de *T. frezii* fue incrementado con una suspensión de  $1 \times 10^4$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$ , distribuida con una pulverizadora manual sobre las parcelas experimentales hasta alcanzar un promedio de  $1,2 \times 10^4$  teliosporas por  $\text{g}^{-1}$  de suelo en el primer año de ensayo. El inóculo fue incrementado hasta  $1,6 \times 10^4$  teliosporas  $\text{g}^{-1}$  de suelo en el segundo y tercer año de ensayo con sucesivas aplicaciones de teliosporas. La densidad del inóculo en las parcelas experimentales fue 3,5 mayor (promedio de los tres años de ensayo) que la máxima densidad detectada en el área de cultivo intensivo de maní (Rago *et al.*, 2017).

El anfidiplóide y el progenitor cultivado de la población interespecífica de RILs en estudio fueron incluidos en el ensayo como controles, resistente y susceptible, respectivamente. Las observaciones fenotípicas de la población interespecífica de RILs y los genotipos parentales se registraron durante tres estaciones de cultivo. El daño causado por el carbón fue evaluado en una muestra de 100 semillas por parcela. Los frutos se abrieron manualmente y se determinó el número de semillas carbonosas y el nivel de masa carbonosa por semilla. La severidad de la enfermedad se estableció usando la escala de 0 a 4 propuesta por Astiz Gassó *et al.*, (2008), donde 0 = fruto y semillas morfológicamente normales y sin infección detectable visualmente, 1 = fruto normal con infección incipiente en una sola semilla, 2 = fruto normal o deformado con una semilla completamente carbonosa, 3 = fruto deformado con una semilla completamente carbonosa y otra con infección incipiente y 4 = fruto deformado con las dos semillas completamente carbonosas (Figura 3.4).



**Figura 3.4** Escala de severidad de carbón del maní: 0 = fruto y semillas morfológicamente normales y sin infección detectable, 1 = fruto normal con infección incipiente en una sola semilla, 2 = fruto normal o deformado con una semilla completamente carbonosa, 3 = fruto deformado con una semilla completamente carbonosa y otra con infección incipiente y 4 = fruto deformado con las dos semillas completamente carbonosas (Astiz Gassó *et al.*, 2008).

La severidad fue usada para calcular un índice de enfermedad (IE) para cada RIL usando la ecuación 3.2.

### Ecuación 3.2

$$IE = \frac{(x_1 \times 1) + (x_2 \times 2) + (x_3 \times 3) + (x_4 \times 4)}{\text{total de frutos} \times 4}$$

donde  $x_n$  es el número de frutos con  $n$  grado de severidad ( $n = 1, \dots, 4$ ). Los frutos afectados fueron registrados como aquellos que presentaron cualquier nivel de síntomas de carbón.

La incidencia fue calculada mediante la ecuación 3.3.

### Ecuación 3.3

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{frutos afectados}}{\text{total de frutos}}$$

cociente entre los frutos afectados sobre el total de frutos en la muestra.



El IE y la incidencia fueron analizados usando un modelo lineal general en la escala sugerida por la transformación Box-Cox a una distribución normal de los términos del error (raíz cuadrada). El modelo lineal general incluyó: genotipo, año y genotipo × año como efectos fijos. La correlación entre las variables transformadas de incidencia e IE fue estimada mediante el método de Pearson. Las medias de cada genotipo fueron comparadas ( $\alpha = 0,05$ ) usando el procedimiento de Scott and Knott, (1974) mediante el paquete de R (Jelihovschi *et al.*, 2014). Los datos se analizaron estadísticamente usando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes de la varianza, ajustando un modelo lineal mixto determinando a los genotipos como efecto aleatorio y año y réplica como efectos fijos. Para el ajuste del modelo se usó el paquete de R glmm (Knudson, 2018). Los resultados se utilizaron para calcular la heredabilidad en sentido amplio usando la ecuación 3.4.

#### **Ecuación 3.4**

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\left(\sigma_g^2 + \frac{\sigma_{g \times y}^2}{m} + \frac{\sigma_e^2}{rm}\right)}$$

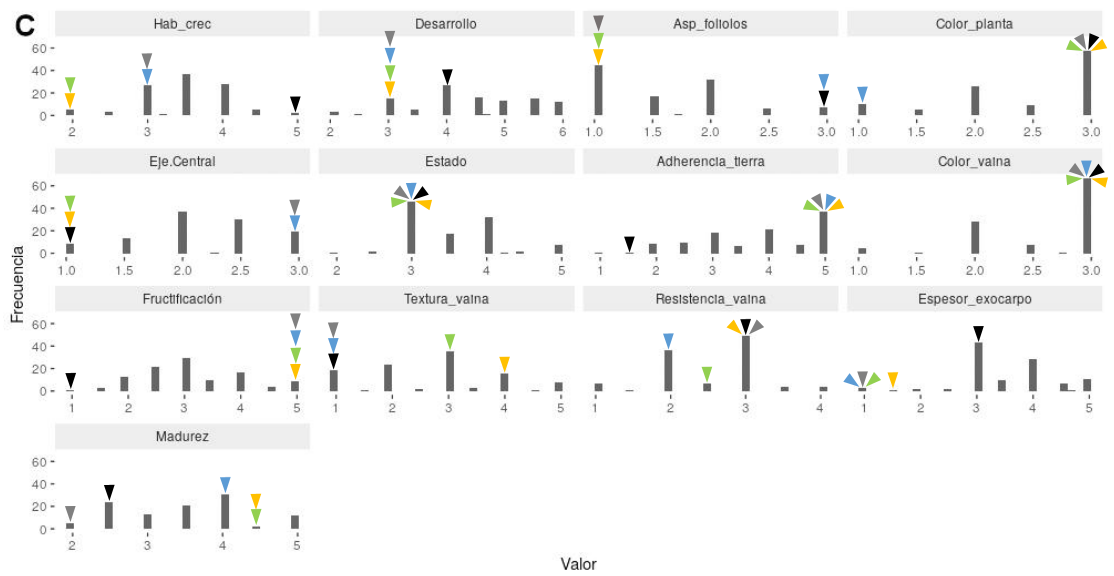
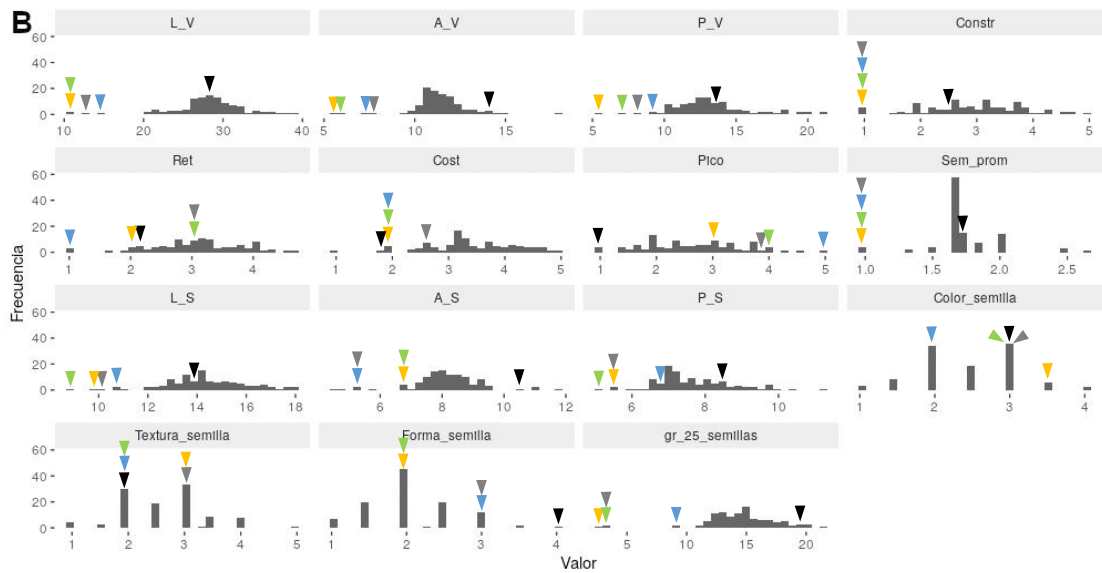
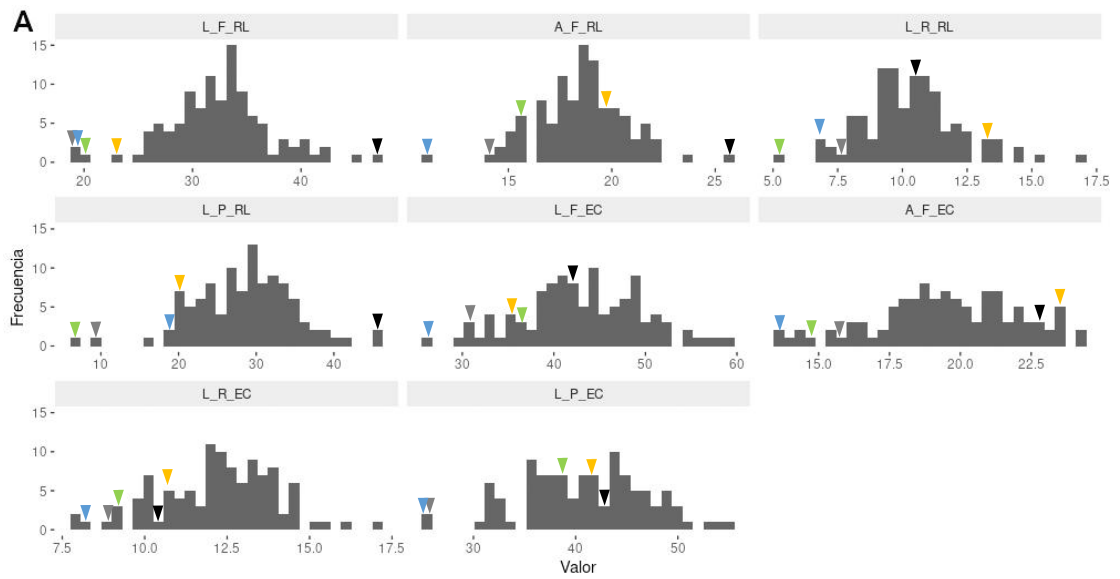
donde  $(\sigma_g^2)$ ,  $\left(\frac{\sigma_{g \times y}^2}{m}\right)$  y  $\left(\frac{\sigma_e^2}{rm}\right)$  son los componentes genéticos, la interacción genotipo × año y el componente residual de la varianza, respectivamente,  $m$  es el número de años y  $r$  es el número de réplicas.

Con los datos fenotípicos se estimó el coeficiente de correlación ( $\alpha = 0,05$ ) entre los caracteres morfológicos de la población interespecífica de RILs y el carbón del maní utilizando el paquete “corrplot” de R (Wei *et al.*, 2017). Finalmente, se indicaron las RILs resistentes en un dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos a partir de una matriz de distancias euclídeas entre los caracteres morfológicos vegetativos, de fruto y de campo, para evaluar la distribución de los diferentes grados de resistencia en los grupos de las RILs según su morfología.

## **RESULTADOS**

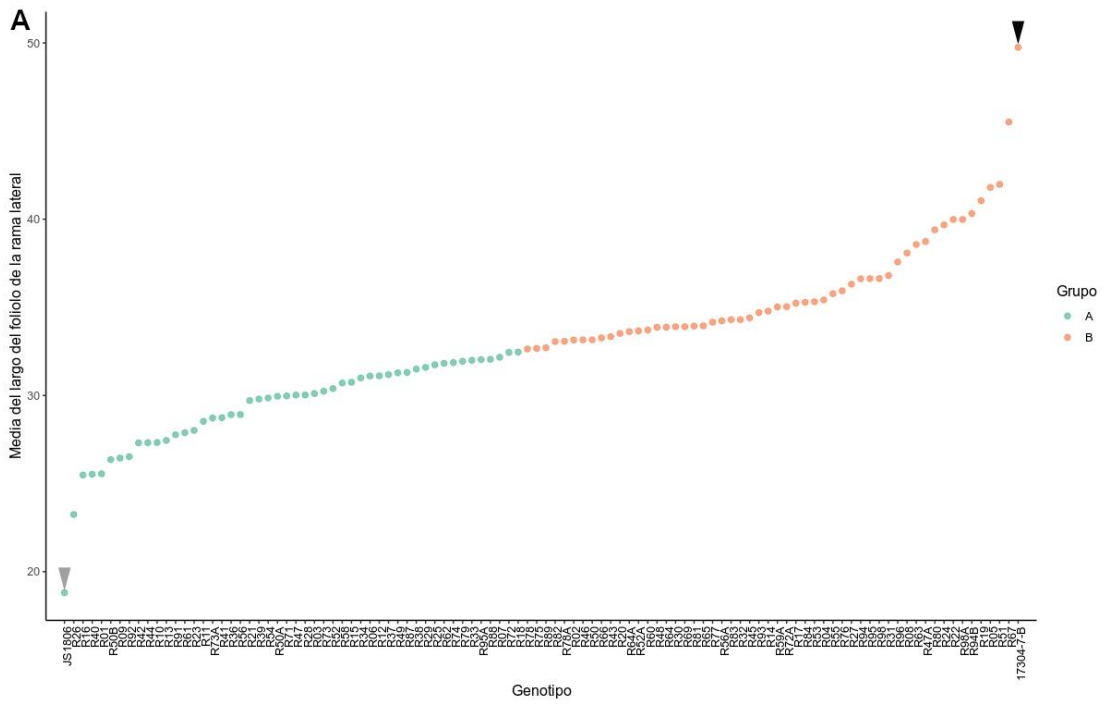
### **Caracterización morfológica**

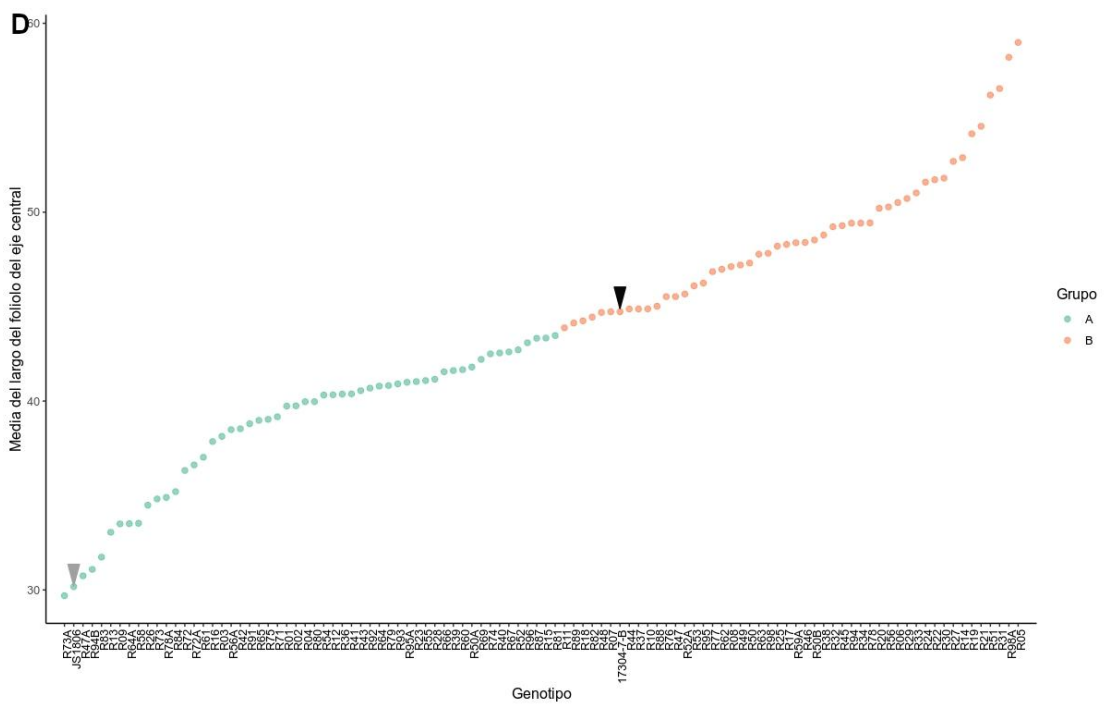
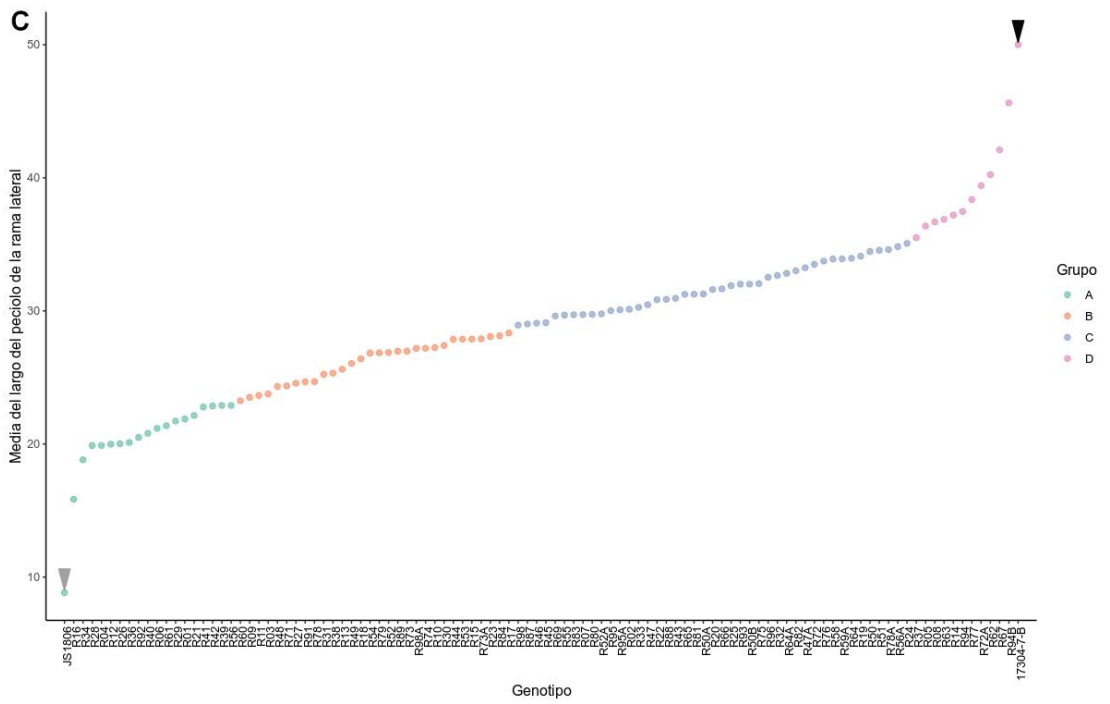
La variabilidad morfológica observada en las RILs registró que cuatro de los ocho caracteres vegetativos cuantitativos y cinco de los ocho caracteres reproductivos cuantitativos mostraron herencia transgresiva. La distribución de los valores cuantitativos se ajustó en general a una distribución normal (Figura 3.5 A y B). La distribución de los valores de las variables discretas se presenta en los histogramas de la Figura 3.5 C.

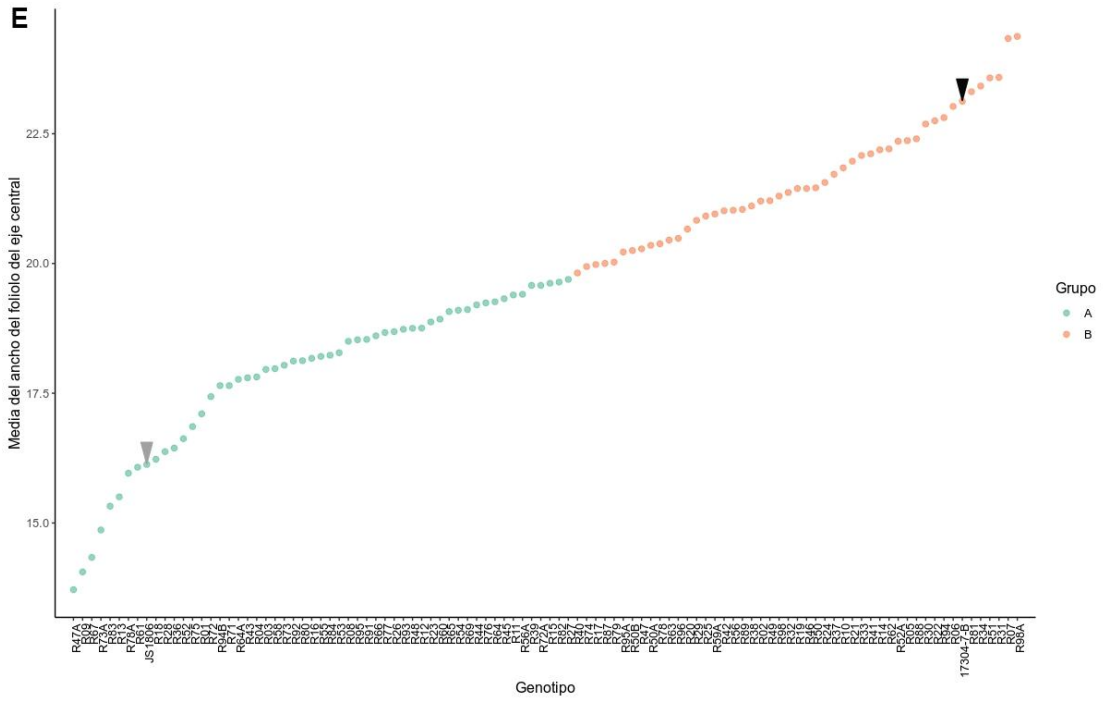


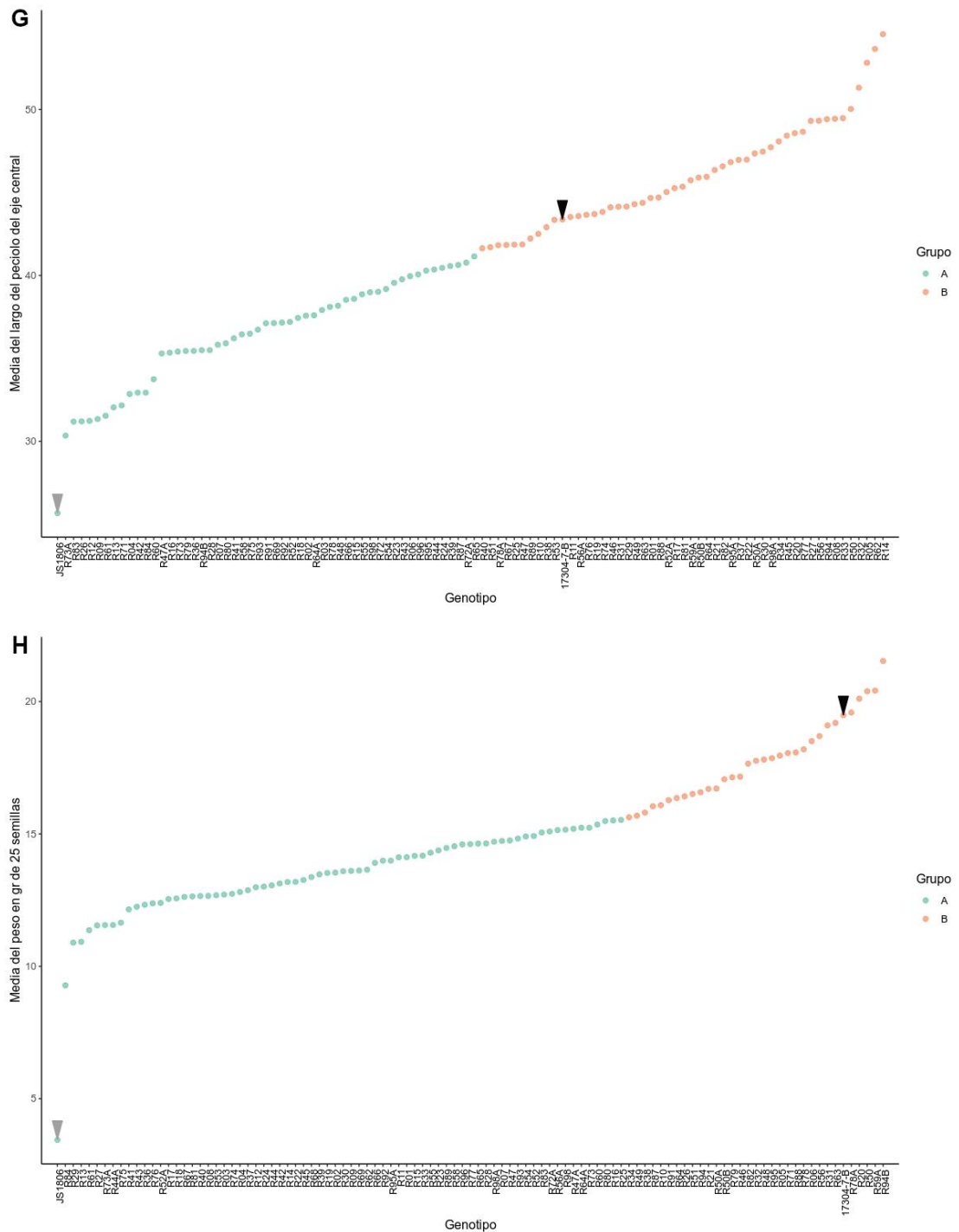
**Fig. 3.5** Histogramas de la distribución de los valores de los caracteres morfológicos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: *A. hypogaea* y anfidiplóide y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. **A:** Caracteres de estructuras foliares. **B:** Caracteres de estructuras reproductivas. **C:** Caracteres cualitativos de campo. Las flechas indican la posición de los silvestres y progenitores de la población interespecífica de RILs; flecha verde = *A. correntina*, flecha amarilla = *A. cardenasii*, flecha celeste = *A. batizocoi*, flecha negra = progenitor *A. hypogaea* y flecha gris = progenitor anfidiplóide. Ver Tabla 3.1 para identificar las abreviaciones.

Las comparaciones de medias para los caracteres cuantitativos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las RILs para todas las variables de caracteres vegetativos con excepción de la variable “Ancho de folíolo en la rama lateral”. En el análisis de los caracteres vegetativos se formaron dos grupos, ubicando a las RILs sin diferencias significativas con el progenitor anfidiplóide en el grupo A y las RILs con valores sin diferencias significativas con el progenitor cultivado en el grupo B (Figura 3.6). En el análisis de la variable “Largo del pecíolo en la rama lateral” se formaron cuatro grupos, ubicando a las RILs con pecíolos más cortos en las ramas laterales en el grupo A, sin diferencias estadísticamente significativas con el progenitor anfidiplóide y a las RILs con pecíolos más largos en las ramas laterales en el grupo D, sin diferencias estadísticamente significativas con el progenitor cultivado (Figura 3.6). En cuanto al análisis de las variables cuantitativas de caracteres reproductivos sólo “Peso en gr de 25 semillas”, mostró agrupamiento de las RILs, ubicando a las mismas en el grupo A sin diferencias estadísticamente significativas con el progenitor anfidiplóide y un grupo B sin diferencias estadísticamente significativas con el progenitor cultivado (Figura 3.6).









**Fig. 3.6** Comparación de medias por el método de Scott & Knott, (1974) de caracteres morfológicos de una población interespecífica de 103 RILs y sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide). **A:** Media del largo del folíolo de la rama lateral. **B:** Media del largo del raquis de la rama lateral. **C:** Media del largo del peciolo de la rama lateral. **D:** Media del largo del folíolo del eje central. **E:** Media del ancho del folíolo del eje central. **F:** Media del largo del raquis del eje central. **G:** Media del largo del peciolo del eje central. **H:**



Media del peso en gramos de 25 semillas. Los grupos en cada gráfico indican medias sin diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ). Las flechas indican la posición de los progenitores de la población interespecífica de RILs; flecha negra = progenitor JS17304-7-B (*A. hypogaea*) y flecha gris = progenitor JS1806 (anfidiplóide).

La media y el desvío estándar (DE) para cada variable evaluada se presentan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Estadísticas de resumen para los caracteres morfológicos usados para caracterizar una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: *A. hypogaea* y anfidiplóide y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide. <sup>a</sup>Variabilidad, referida a los valores observados alrededor de la media de cada carácter.

Caracter	Media	DE	Rango	Variabilidad <sup>a</sup>
L_F_RL	32.49	4.80	18.81 - 46.65	23.07
A_F_RL	18.53	2.14	11 - 25.6	4.58
L_R_RL	10.33	1.91	5.17 - 16.84	3.66
L_P_RL	28.51	6.51	7 - 45.9	42.37
L_F_EC	43.22	6.56	26 - 58.99	43.00
A_F_EC	19.56	2.46	13.72 - 24.38	6.04
L_R_EC	12.24	1.73	7.88 - 17.04	3.00
L_P_EC	40.89	5.95	25 - 54.55	35.35
L_V	27.99	4.79	10.48 - 38.81	22.95
A_V	11.44	1.57	5.5 - 17.9	2.46
P_V	13.30	2.82	5.6 - 21.27	7.98
Constr	2.95	0.87	1 - 5	0.76
Ret	3.07	0.73	1 - 2.33	0.06
Cost	3.42	0.76	1 - 3	0.23
Pico	2.63	0.82	1 - 3	1.00
Sem_prom	1.73	0.25	1 - 2.67	0.06
L_S	14.31	1.69	8.95 - 18.1	2.87
A_S	8.15	1.08	4.62 - 11.89	1.18
P_S	7.63	1.05	5.02 - 11.16	1.11
Color_semilla	2.48	0.63	1 - 4	0.40
Textura_semilla	2.66	0.74	1 - 5	0.55
Forma_semilla	2.09	0.58	1 - 4	0.34
g_25_semillas	14.51	3.10	2.7 - 21.54	9.64
Hab_crec	3.48	0.59	2 - 5	0.35
Desarrollo	4.40	1.03	2 - 6	1.05
Asp_foliolos	1.59	0.61	1 - 3	0.37
Color_planta	2.46	0.67	1 - 3	0.45
Eje Central	2.18	0.57	1 - 3	0.32
Estado	3.53	0.63	2 - 5	0.39

**Tabla 3.2** Continuación

Caracter	Media	DE	Rango	Variabilidad <sup>a</sup>
Adherencia_tierra	3.86	1.07	1 - 5	1.15
Color_vaina	2.62	0.55	1 - 3	0.30
Fructificación	3.14	0.92	1 - 5	0.86
Textura_vaina	2.74	1.17	1 - 5	1.36
Resistencia_vaina	2.55	0.69	1 - 4	0.47
Espesor_exocarpo	3.53	0.87	1 - 5	0.75
Madurez	3.48	0.84	2 - 5	0.70

Los mayores rangos de variación entre genotipos se observaron en relación a: Peso en g de 25 semillas, Largo de vaina (sin diferencias estadísticamente significativas entre genotipos), Largo de folíolo en la rama lateral, Largo del pecíolo en el eje central, Largo del pecíolo en la rama lateral y Largo del folíolo del eje central. La diversidad fenotípica estimada por el índice de Shannon–Weaver para las variables morfológicas medidas presentó valores muy similares entre ellas (Tabla 3.3).

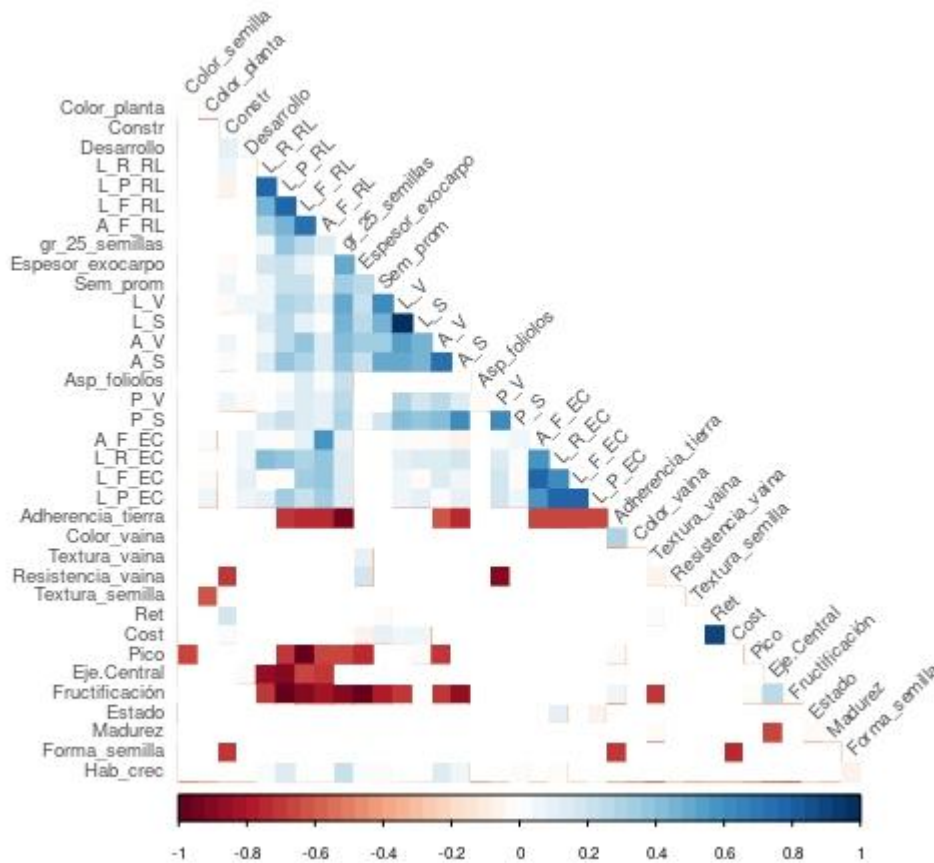
**Tabla 3.3** Valores del índice de Shannon–Weaver para cada caracter morfológico medido en una población interespecífica de 103 RILs y en los progenitores (*A. hypogaea* y anfidiplóide).

Caracter	Índice de Shannon
Textura_vaina	0.4578
Asp_foliolos	0.4602
Pico	0.4626
Constr	0.4627
Fructificación	0.4629
Color_planta	0.4631
Adherencia_tierra	0.4631
Textura_semilla	0.4633
Forma_semilla	0.4634
Resistencia_vaina	0.4636
Eje.Central	0.4637
Color_semilla	0.4640

**Tabla 3.3** Continuación

Caracter	Índice de Shannon
Espesor_exocarpo	0.4640
Madurez	0.4644
Ret	0.4644
Desarrollo	0.4645
L_P_RL	0.4645
gr_25_semillas	0.4647
Cost	0.4647
Color_vaina	0.4648
P_V	0.4651
L_R_RL	0.4656
L_V	0.4657
Estado	0.4657
Hab_crec	0.4658
L_F_EC	0.4661
L_F_RL	0.4662
L_P_EC	0.4662
Sem_prom	0.4663
L_R_EC	0.4663
A_V	0.4663
P_S	0.4664
A_S	0.4664
A_F_EC	0.4665
L_S	0.4666
A_F_RL	0.4666

Al examinar las 1260 correlaciones computadas, 440 fueron significativas ( $\alpha = 0,05$ ), presentando valores de coeficiente de correlación entre -0,43 (correlación negativa entre “constricción de fruto”/“resistencia al quiebre de la vaina”) a 0,86 (correlación positiva entre “largo de vaina”/“largo de semilla”) (Figura 3.7).



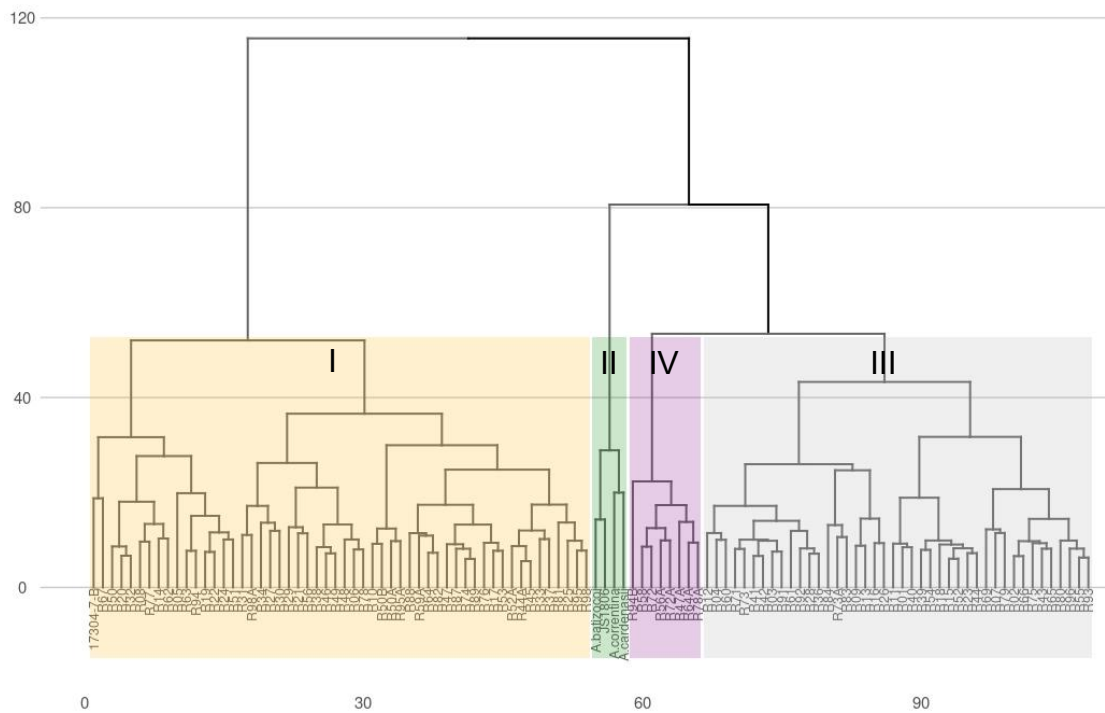
**Fig. 3.7** Correlaciones entre caracteres fenotípicos medidos en una población interespecífica de 103 RILs y en sus progenitores (*A. hypogaea* y anfidiploide). Representación de los niveles de correlación por color: azul oscuro corresponde a correlaciones = 1 y color rojo oscuro corresponde a correlaciones = -1.

A los fines de facilitar la identificación y análisis de correlaciones que podrían presentar relevancia biológica, las 440 correlaciones significativas fueron divididas en seis grupos diferentes:

1. Caracteres vegetativos cuantitativos - Caracteres vegetativos cuantitativos
2. Caracteres vegetativos cuantitativos - Caracteres reproductivos cuantitativos
3. Caracteres vegetativos cuantitativos - Caracteres cualitativos
4. Caracteres reproductivos cuantitativos - Caracteres reproductivos cuantitativos
5. Caracteres reproductivos cuantitativos - Caracteres cualitativos
6. Caracteres cualitativos - Caracteres cualitativos

El grupo 1, presentó correlaciones biológicamente significativas ( $>0,71$ ) para los caracteres: “Largo del raquis en la rama lateral”/“Largo del pecíolo en la rama lateral”, “Largo del raquis en la rama lateral”/“Largo del pecíolo en la rama lateral”, “Largo del folíolo en la rama lateral”/“Largo del pecíolo en la rama lateral” y “Largo de folíolo en el eje central”/“Largo del pecíolo en el eje central”. El grupo 2, no presentó correlaciones biológicamente significativas, con un valor máximo de 0,49 para la correlación entre “Largo del pecíolo en la rama lateral”/“Ancho de semilla”. Por otro lado, el grupo 3 no presentó correlaciones biológicamente significativas, con un valor máximo de 0,37 para la correlación entre “Largo del pecíolo en la rama lateral”/“Espesor del exocarpo”. El grupo 4 ostentó los valores más altos de correlación (0,86 y 0,83) para las variables “Largo de vaina”/“Largo de semilla” y “Ancho de vaina”/“Ancho de semilla”, respectivamente. El grupo 5 no resultó con correlaciones biológicamente significativas mostrando para las variables “Ancho de vaina”/“Espesor del exocarpo” un valor de 0,44. Finalmente, el grupo 6 mostró correlaciones con significado biológico; con un valor máximo de 0,83 para las variables “Costilla”/“Reticulo del exocarpo”.

El análisis de conglomerados permitió identificar cuatro grupos fenotípicos en los materiales evaluados (Figura 3.8). Un grupo formado por RILs con morfología similar al progenitor cultivado (I), un grupo exclusivo de las tres especies diploides silvestres y al anfidiplóide (II), y dos grupos (III y IV) formados exclusivamente por RILs con valores intermedios respecto a ambos progenitores. El análisis mostró, además, que las 14 RILs derivadas de las 96 RILs originales, en general, presentaron un fenotipo diferente. En algunos casos, la línea original y la derivada quedaron en el mismo grupo fenotípico, como fue el caso de las RILs 72 y 72A, pero en otros, se ubicaron en grupos diferentes como las RILs 47, 47A o 64 y 64A.

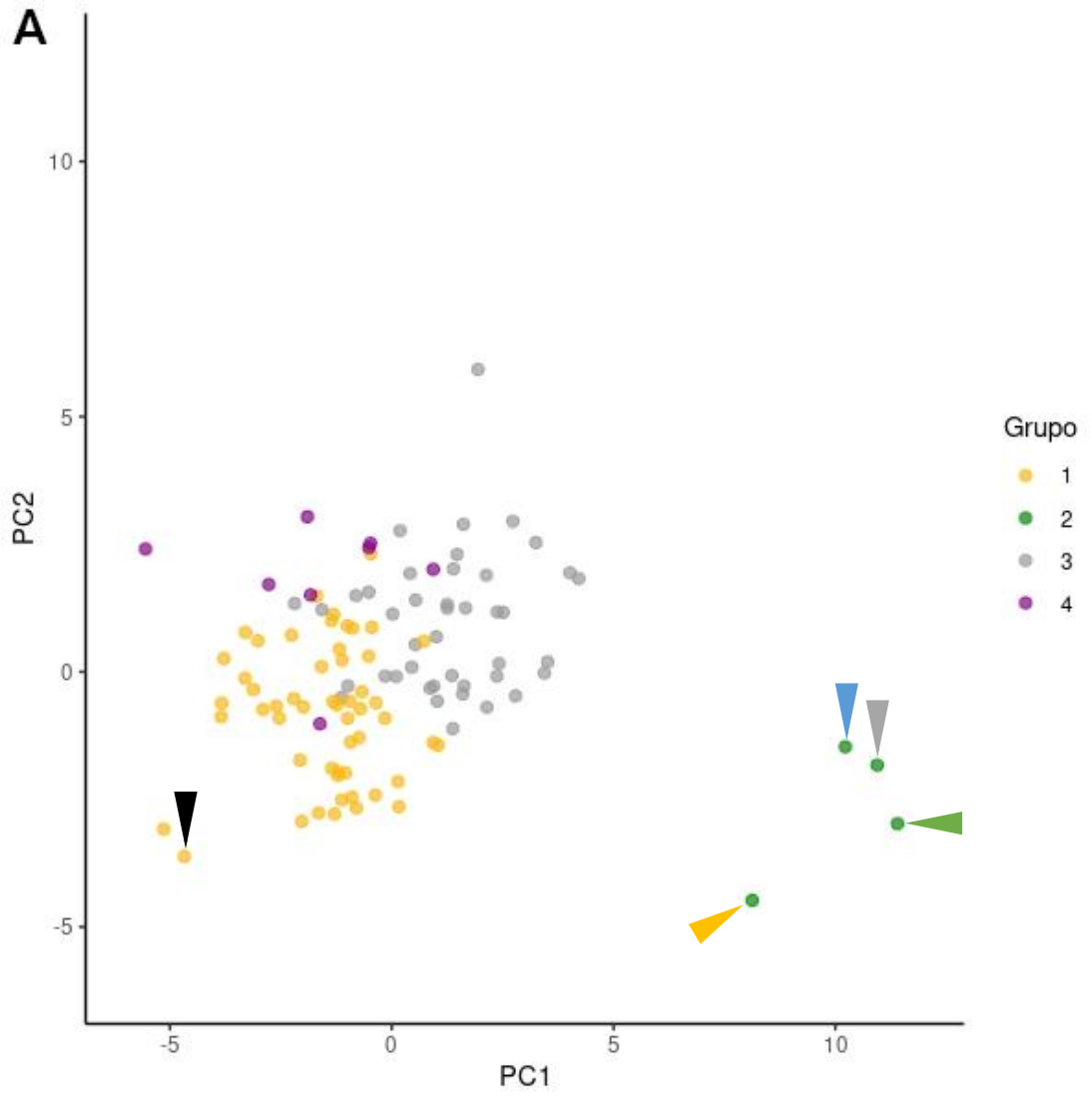


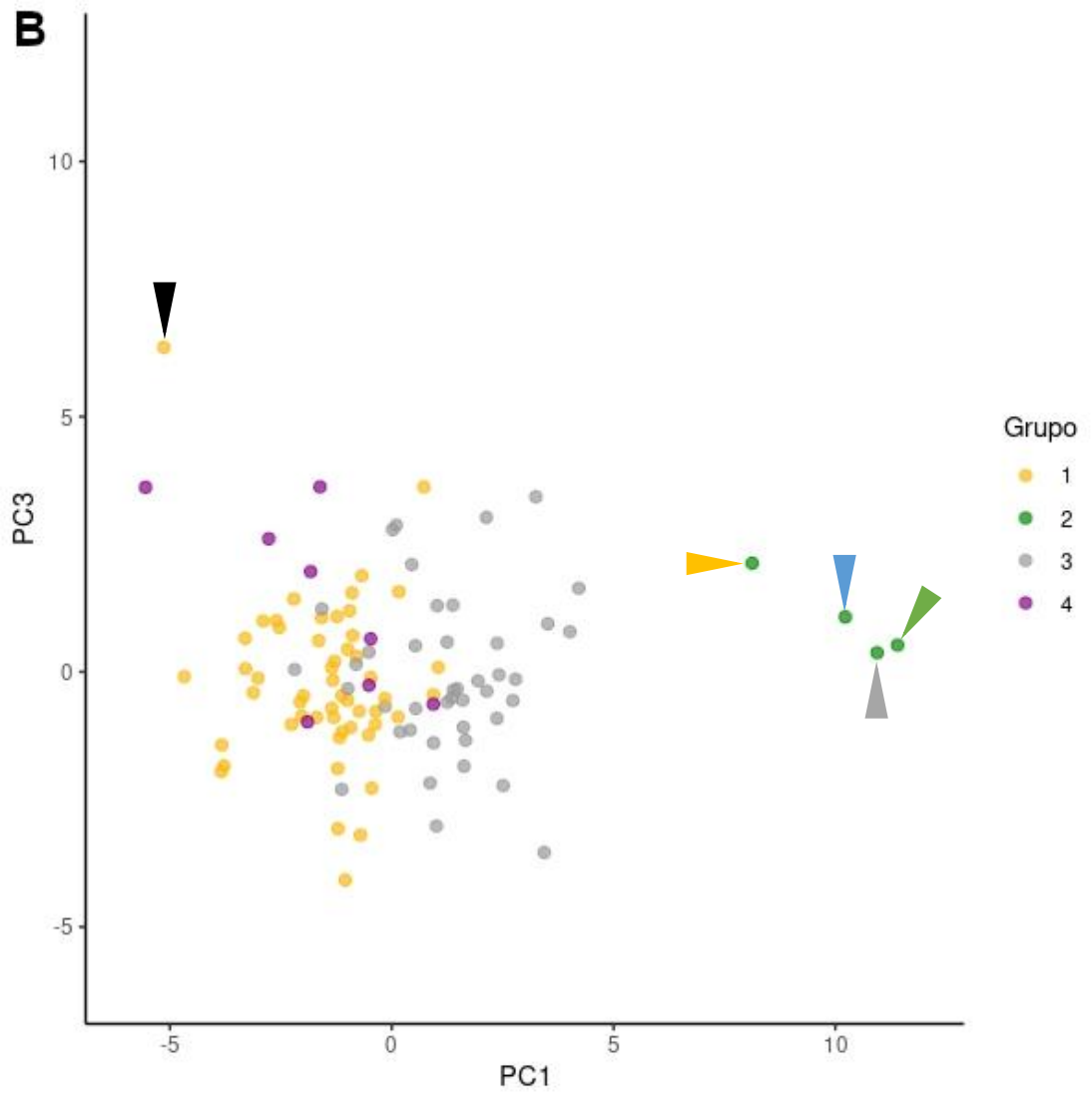
**Fig. 3.8** Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos a partir de una matriz de distancias euclídeas entre los genotipos de una población interespecífica de 103 RILs y sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiploide) y los silvestres que dieron origen al anfidiploide. En el eje y se indica la distancia fenética entre los genotipos evaluados. Con colores distintos se indican los diferentes grupos de genotipos. Los números romanos indican el grupo en el que se ubicaron los genotipos.

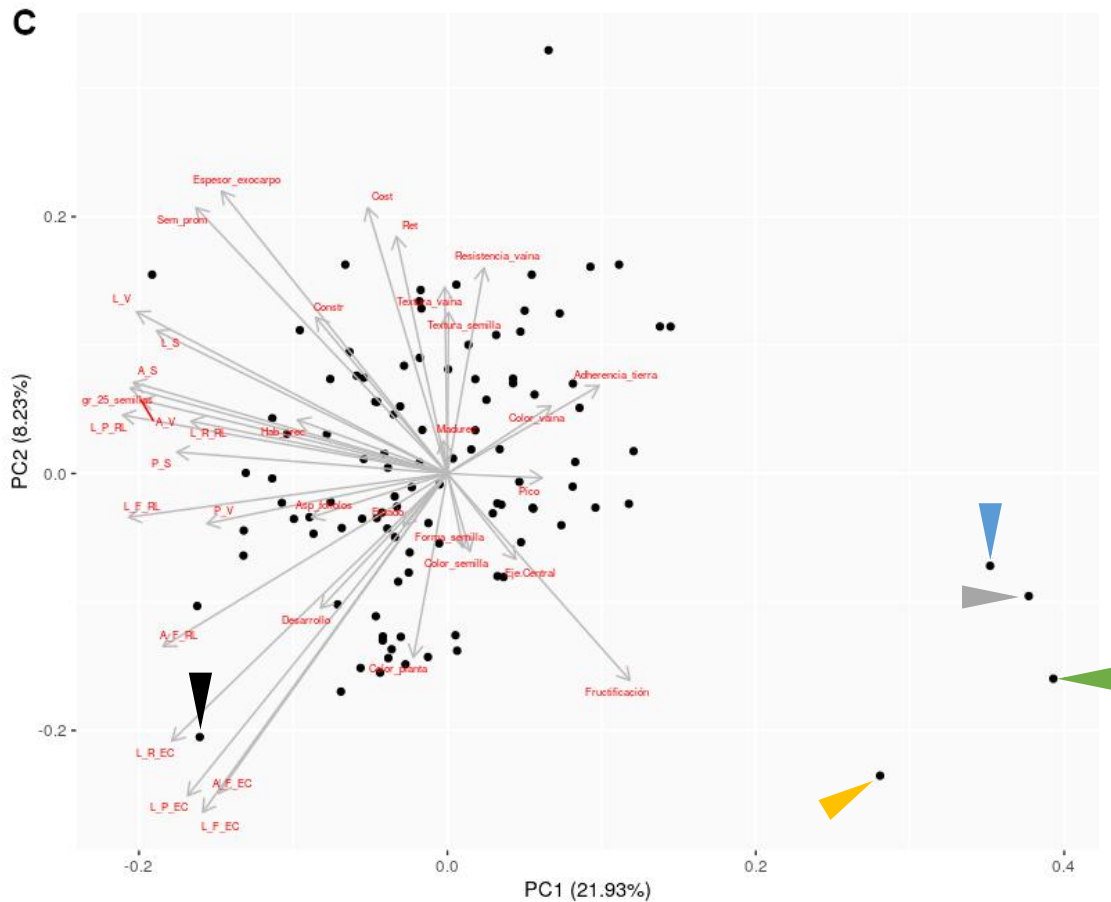
El análisis de componentes principales mostró que las cinco primeras componentes explicaron en conjunto el 47% de la variabilidad fenotípica para los 36 caracteres fenotípicos medidos. En la Figura 3.9 se observa que las nubes de puntos resultantes de la proyección ortogonal sobre CP1/CP2 y CP1/CP3 (A y B) coinciden con los grupos definidos por el análisis de conglomerados jerárquicos. En la Figura 3.9 C se presenta la proyección de los autovectores de cada uno de los caracteres morfológicos sobre las CP1/CP2, que indican la influencia de cada variable en la definición de los grupos fenéticos. Las variables más significativas para la conformación de los grupos fenéticos fueron los caracteres morfológicos cuantitativos de estructuras foliares ya que presentaron los autovectores de mayor magnitud sobre las CP1 y CP2, mientras que los caracteres morfológicos cuantitativos de estructuras reproductivas presentaron, en conjunto,

autovectores de mayor magnitud sobre la CP1. Otras variables de caracteres reproductivos cualitativos presentaron autovectores de magnitud considerable sobre la CP2. El ACP permitió reducir el número de variables en la diferenciación de los genotipos de 39 a 19.







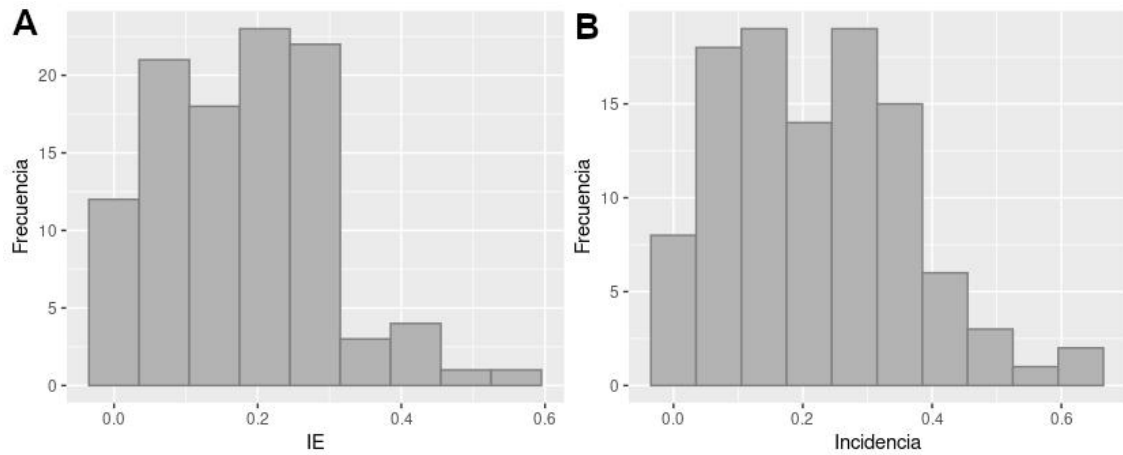


**Fig. 3.9** Gráficos resultantes del análisis de componentes principales de los caracteres morfológicos medidos en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide. **A:** Proyección sobre las CP1 y CP2. **B:** Proyección sobre las CP1 y CP3. La coloración de los puntos indica el grupo al que pertenece cada genotipo según el análisis de conglomerados a partir de distancias euclídeas entre los genotipos y método de Ward. **C:** Visualización de los autovectores de las variables morfológicas proyectados en la CP1 y CP2. Las flechas indican la posición de los genotipos silvestres y de los progenitores de la población interespecífica de RILs; flecha verde = *A. correntina*, flecha amarilla = *A. cardenasii*, flecha celeste = *A. batizocoi*, flecha negra = progenitor *A. hypogaea* y flecha gris = progenitor anfidiplóide

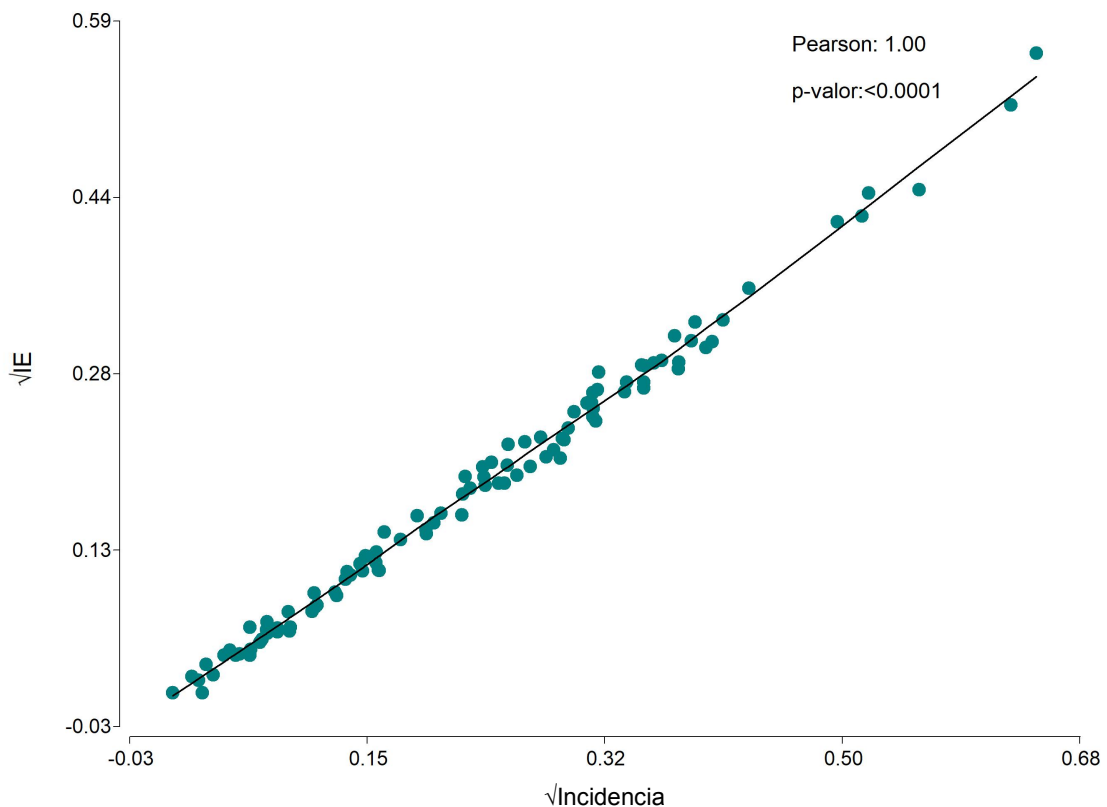
### Evaluación fenotípica de resistencia al carbón del maní

La caracterización fenotípica de la población interespecífica de RILs F<sub>7</sub>:F<sub>9</sub> para carbón del maní con una alta densidad de inóculo (1,2 - 1,6 10<sup>4</sup> teliosporas g<sup>-1</sup> de suelo)

mostró una incidencia media de 23% (con un rango de 0 a 65% en los tres años de evaluación) y un IE medio de 0,18 (con un rango de 0 a 0,56) (Figura 3.10). El coeficiente de correlación de Pearson entre las variables transformadas de incidencia e IE fue = 1 ( $P = <0.0001$ ) (Figura 3.11), por lo que sólo se presentarán los resultados correspondientes a incidencia.



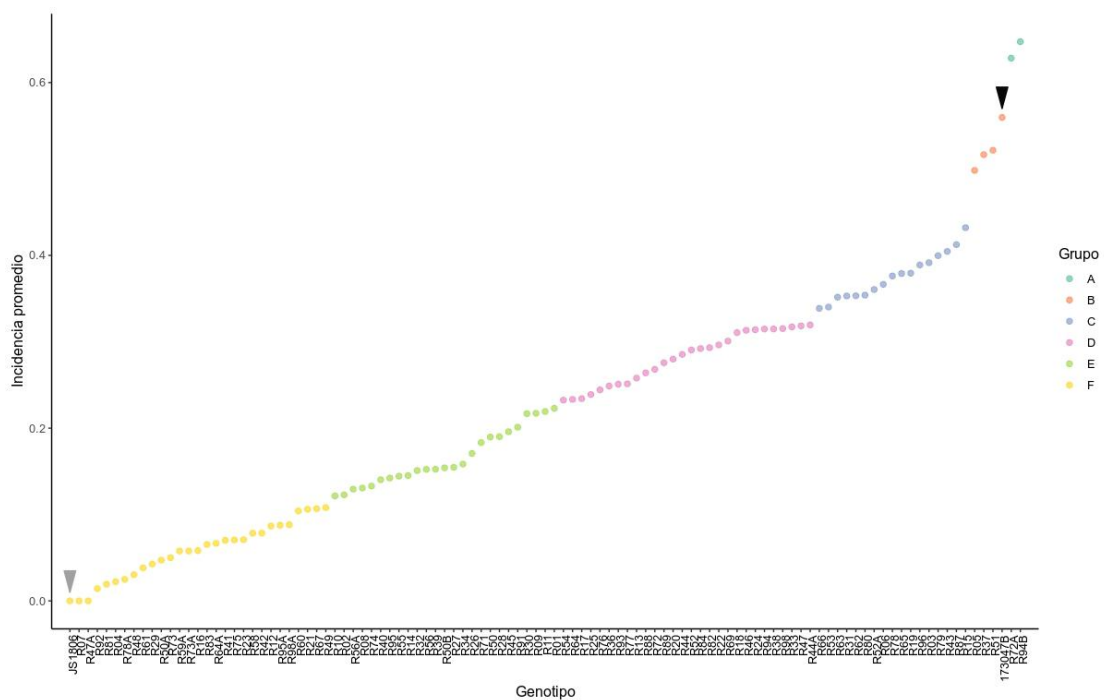
**Fig. 3.10** Distribución de las variables transformadas de índice de enfermedad (IE) (A) e incidencia (B) de carbón del maní, en una en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide



**3.11** Correlación de Pearson entre las variables transformadas de incidencia e IE de carbón del maní, en una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide.

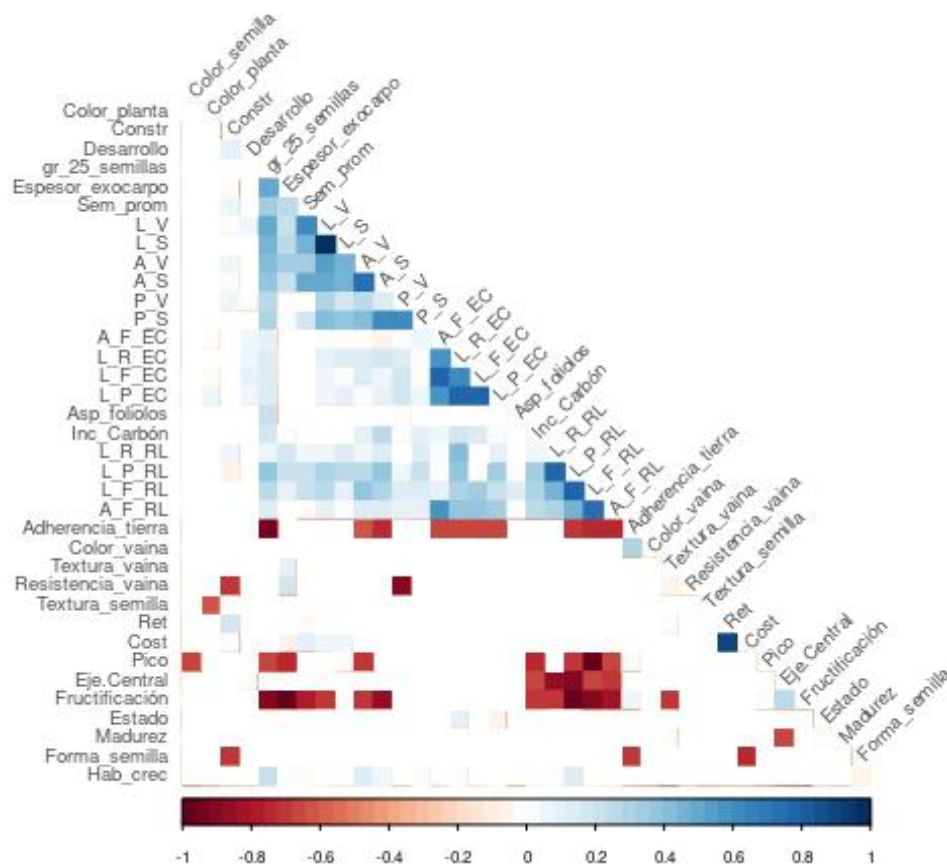
Los valores promedio de incidencia de carbón del maní (0,17; 0,23 y 0,27) entre los años evaluados (2016, 2017y 2018, respectivamente) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ). La variancia genética fue mayor que la variancia de la interacción genotipo  $\times$  ambiente (58,7% [ $P < 0.0001$ ] vs. 12% [ $P < 0.0017$ ] para la incidencia]. La heredabilidad en sentido amplio para la incidencia fue alta ( $H^2 = 0,95$ ). Por lo tanto, a pesar de las diferencias de los valores de incidencia entre años, el ordenamiento de las RILs con respecto a la resistencia al carbón del maní se mantuvo constante durante los años en que se desarrolló el estudio. Para el progenitor susceptible, el promedio interanual de incidencia fue del 56% (0,37% - 0,69%, de rango inter-anual) mientras que, para el anfidiplóide, la incidencia promedio fue de 0%. En la población interespecífica de RILs  $F_{7:9}$  se observó un amplio rango de respuesta. Las comparaciones de a pares realizadas por el test de Scott and Knott (1974) agrupó a las RILs en seis grupos

(Figura 3.12). Un grupo de veintinueve líneas tuvieron un valor de incidencia < 11% y no mostró diferencias estadísticamente significativas con el anfidiplóide y las especies silvestres evaluadas (líneas de control resistentes). El promedio de incidencia de esas líneas fue de 6% con un rango entre 0% y 11%. Dentro del grupo de líneas resistentes, seis genotipos (R04, R07, R47A, R78A, R81, R92) demostraron un comportamiento de elevada resistencia al carbón del maní, con un promedio interanual de incidencia < 1%. En contraposición, tres genotipos presentaron una incidencia > 50% y no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el progenitor cultivado susceptible. Dos genotipos (94B y 72A) presentaron segregación transgresiva, con incidencia significativamente mayor que el progenitor susceptible ( $P = <0.05$ ), representando el 1.9% de la progenie.



**Fig. 3.12** Representación de la incidencia promedio interanual registrada para el carbón del maní en las 103 RILs derivadas del cruzamiento de una línea *A. hypogaea* y el anfidiplóide. El agrupamiento se realizó de acuerdo a la comparación de medias mediante el método de Scott and Knott (1974). Los grupos se definieron como: A, B, C, D, E y F. Las flechas indican la posición de los progenitores de la población interespecífica de RILs; flecha negra = progenitor JS17304-7-B (*A. hypogaea*) y flecha gris = progenitor JS1806 (anfidiplóide).

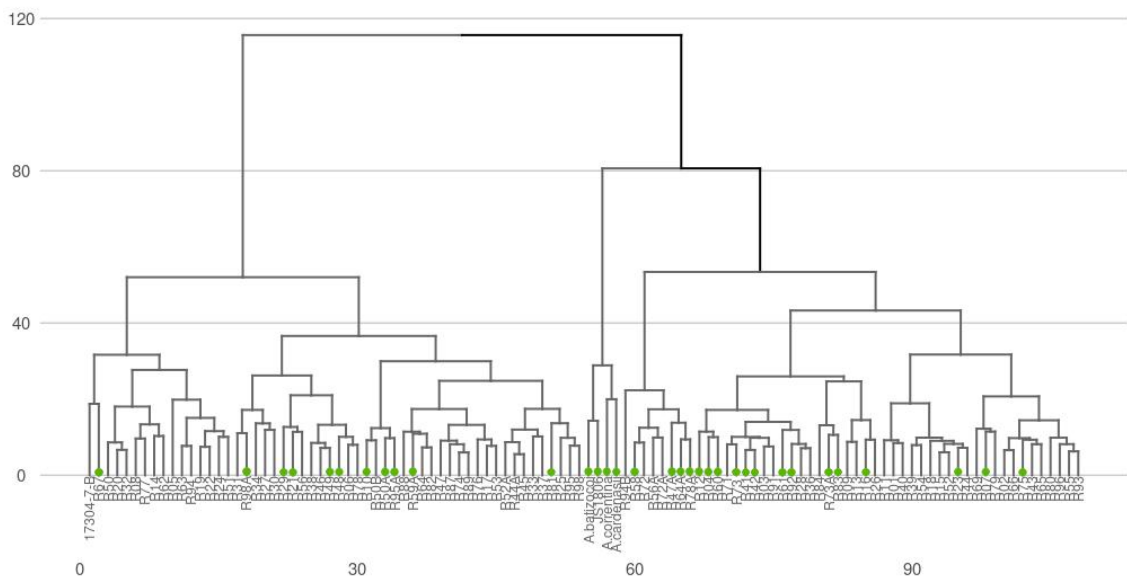
El análisis de correlación entre las variables morfológicas y la resistencia al carbón del maní evidenció 20 correlaciones estadísticamente significativas (Figura 3.13). Sin embargo, ninguna de ellas presentó significancia biológica de acuerdo al criterio de Skinner *et al.*, 1999. Los mayores valores se observaron para las correlaciones entre la incidencia al carbón del maní y las variables morfológicas vegetativas (~ 0,34) y también se observaron correlaciones entre la incidencia del carbón del maní y las variables morfológicas de fruto (~0,31). Además, se observaron correlaciones entre la “incidencia del carbón del maní”/“espesor del exocarpo” (0,21) e “incidencia del carbón del maní”/“fructificación” (-0,23)



**Fig. 3.13** Gráfico de las correlaciones significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre caracteres morfológicos e incidencia del carbón del maní, medidos en una población interespecífica

de 103 RILs, y sus progenitores *A. hypogaea* y anfidiplóide. Color: azul oscuro corresponde a correlaciones = 1 y color rojo oscuro corresponde a correlaciones = -1.

La distribución de las 29 RILs que presentaron resistencia al carbón (según el análisis de Scott Knott) en los grupos formados en el análisis de conglomerados entre las RILs, sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y los silvestres que dieron origen al anfidiplóide mostró diferencias significativas según los grupos morfológicos a los que pertenecen (Figura 3.14). El análisis de diferencias de proporciones evidenció una diferencia del 20% ( $P < 0.05$ ) entre el número de RILs resistentes que pertenecen a grupos exomorfológicos similares al progenitor anfidiplóide y las que pertenecen al grupo con exomorfoloía similar a *A. hypogaea*. Sin embargo, se han detectado un número relativamente importantes de RILs resistentes con fenotipos cercanos al progenitor cultivado (JS 17304-7-B).



**Fig. 3.14** Distribución de las 29 RILs resistentes al carbón del maní sobre el dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos a partir de una matriz de distancias euclídeas entre los genotipos de una población interespecífica de 103 RILs, sus progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y los silvestres que dieron origen al anfidiplóide. Los puntos verdes indican los genotipos resistentes (incidencia  $> 11\%$ ) al carbón del maní.



## DISCUSIÓN

La caracterización morfológica de las poblaciones derivadas de cruzamientos interespecíficos es una de las primeras aproximaciones en el estudio de los atributos genéticos que presentan las mismas a partir de la introgresión de genes silvestres (Carvalho y Quesenberry, 2009; Hancock *et al.*, 2019). Los 13 caracteres cualitativos y 26 caracteres cuantitativos medidos en esta tesis para caracterizar la población interespecífica de 103 RILs permitieron agrupar los genotipos por su similitud y disimilitud, mediante análisis multivariados. Los cuatro grupos generados representan a genotipos con menor variabilidad dentro y máxima variabilidad entre. Los coeficientes de correlación estimados entre los caracteres medidos permitieron identificar aquellos que explican >50% de la variabilidad de otra variable correlacionada (>0.71). Por otro lado, la evaluación de resistencia al carbón del maní en la población interespecífica de 103 RILs revela que la resistencia transferida a 29 de las líneas es estable con una elevada presión de inóculo en los tres años de estudio. Estas RILs constituyen un grupo con una alta variabilidad en caracteres fenotípicos morfológicos, hecho que brinda al mejorador una amplia gama de posibilidades para incorporar genotipos de interés a los programas de mejoramiento.

### Caracterización morfológica

El rango amplio de valores observado en los caracteres fenotípicos medidos en la población interespecífica de RILs puede atribuirse a la introgresión de porciones cromosómicas desde las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide en el contexto tetraploide de *A. hypogaea*. Las variables identificadas con autovectores de elevada magnitud en el ACP (tamaño de los frutos, semillas y dispersión de la fructificación) son caracteres importantes para el mejoramiento del maní (Wynne *et al.*, 1981). El porcentaje de varianza explicado por los primeros cinco componentes principales (47%) es similar al valor obtenido para la detección de variabilidad fenotípica por Upadhyaya *et al.* (2001) en la colección núcleo de *A. hypogaea* del ICRISAT (49,21%). La varianza explicada por las cinco primeras componentes principales permitió reducir las variables de 39 a 19. Las mismas clasificaron a las RILs en cuatro grupos, en concordancia con lo observado en la colección núcleo de *A. hypogaea* del ICRISAT (Upadhyaya *et al.*, 2001) (18 de 36). La diversidad fenotípica estimada por el índice de Shannon-Weaver para las variables

morfológicas medidas en la población interespecífica de RILs presentaron valores medios muy similares ( $\sim 0,46$ ) entre sí y con los valores obtenidos para la sección *Arachis* por Vishwakarma *et al.* 2017 (0,46), evidenciando una buena representación de la variabilidad existente en las especies silvestres.

Estudios en líneas de introgresión a partir de la obtención de un hexaploide entre *A. correntina* y *A. hypogaea* mostraron que los valores de los caracteres morfológicos medidos en la progenie, en general, se distribuían entre los extremos de los progenitores (García *et al.*, 1995, 1996; Stalker *et al.*, 1979; Stalker, 1984). En el estudio realizado en esta tesis los valores morfológicos de las RILs obtenidas a partir de un anfidiplóide sintético y *A. hypogaea* presentaron segregación transgresiva para los caracteres L\_R\_RL, L\_F\_EC, L\_R\_EC, L\_P\_EC, L\_V, P\_V, Sem\_Prom, L\_S y P\_S. Este patrón de segregación puede interpretarse acorde a diferentes fenómenos como son la constitución interespecífica múltiple, la poliploidía inducida para la obtención del anfidiplóide y la recombinación de los cromosomas de *A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi* con los cromosomas de *A. hypogaea*. Estos tres fenómenos habrían provocado la acumulación de genes en la progenie con efecto aditivo y acción complementaria (Rieseberg *et al.*, 1999) causando la segregación transgresiva de los caracteres mencionados. Curiosamente, aun cuando el progenitor anfidiplóide derivado de esta especie, manifestó valores opuestos al progenitor cultivado para la mayoría de los caracteres cuantitativos medidos, *A. cardenasii* presentó valores superiores a *A. hypogaea* en dos de las variables morfológicas cuantitativas (L\_R\_RL y A\_F\_EC). Esto sugiere la existencia de alelos en las especies silvestres que podrían explicar la segregación transgresiva. Recientemente, se informó sobre el análisis morfológico de una población de RILs obtenida por el cruzamiento de *A. hypogaea* cv. tipo rastrojero IAC 886 (Suassuna *et al.*, 2020) y un alotetraploide (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)<sup>4x</sup> (Fávero *et al.*, 2006). Las publicaciones documentan la existencia de segregación fenotípica transgresiva para la morfología. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el presente estudio y permiten sustentar que la acumulación de genes con acción complementaria y efecto dominante podría ocurrir como consecuencia del método de obtención de los anfidiplóides y de las RILs. Aun así, es necesario profundizar en la investigación de este fenómeno para comprender el efecto de la utilización de híbridos interespecíficos complejos en los programas de mejoramiento genético para obtener nuevos cultivares de maní.

## **Correlación entre los caracteres morfológicos**

Se identificaron 440 correlaciones significativas ( $\alpha = 0,05$ ), aunque sólo unas pocas presentaron valores absolutos  $> 0,71$  y, por ende, con significancia biológica (Skinner *et al.*, 1999). Las correlaciones consideradas de esta manera explican más del 50% de la varianza de un carácter predicho por el otro. Considerando sólo las correlaciones con significancia biológica el grupo 1 (Caracteres vegetativos cuantitativos - Caracteres vegetativos cuantitativos) el grupo 4 (Caracteres reproductivos cuantitativos - Caracteres reproductivos cuantitativos) y grupo 6 (Caracteres cualitativos - Caracteres cualitativos) presentaron correlaciones cuyas varianzas pueden ser predichas por el otro carácter con valores  $>50\%$ . Examinando la información de los grupos con correlaciones con significancia biológica ( $>0,71$ ), las altas correlaciones observadas entre los caracteres L\_R\_RL/L\_P\_RL, L\_R\_RL/L\_P\_RL, L\_F\_RL/L\_P\_RL y L\_F\_EC/L\_P\_EC del grupo 1; entre L\_V/L\_S y A\_V/A\_S del grupo 4 y entre las variables Cost/Ret del grupo 6 indica que las variables vegetativas L\_R\_RL, L\_P\_RL, L\_F\_RL, L\_F\_EC y L\_P\_EC podrían ser usadas como criterios de selección en programas de mejoramiento en los cuales desean modificar características foliares y los caracteres L\_V, A\_V y Cost en aquellos que se deseen modificar parámetros morfológicos de fruto.

## **Evaluación fenotípica de resistencia al carbón del maní**

La caracterización fenotípica evidenció un amplio rango de resistencia a la enfermedad en la población interespecífica de RILs. Considerando el alto nivel de inóculo usado en el ensayo de campo ( $1.2 - 1.6 \times 10^4$  teliosporas  $g^{-1}$  de suelo), los registros de resistencia estable con valores cercanos 0% (de 0 to 0,07%) en 29 RILs son importantes para el desarrollo futuro de variedades comerciales con resistencia al carbón del maní. Aún más, el hecho de que el 85% de las RILs presentaron valores de incidencia menores a aquellas reportadas por Capello and Dignani, (2014) en lotes comerciales con tres veces menos inóculo en el suelo que el usado en este estudio. Estos resultados indican que la resistencia encontrada en este trabajo en las especies silvestres fue transferida en una proporción considerable de las RILs, aunque en diferentes grados. La resistencia transferida fue

estable con una elevada presión de inóculo en los años de estudio. El valor alto de  $H^2$  de la incidencia es consistente con la alta correlación entre el ordenamiento interanual de cada RIL, lo que sugiere un elevado componente genético del carácter.

Los resultados de segregación obtenidos para la incidencia al carbón del maní sugieren que el carácter está gobernado por pocos genes con efecto aditivo, hecho que simplificaría la transferencia del carácter en el mejoramiento de variedades resistentes, respecto a caracteres cuantitativos más complejos (Al-Khayri *et al.*, 2015). Sin embargo, esta estructura genética relativamente simple elevaría la probabilidad de que la resistencia sea quebrada a mediano plazo (Johnson, 1983).

La introgresión de segmentos cromosómicos desde especies silvestres diferentes garantiza mayor durabilidad de la resistencia adquirida (Hancock *et al.*, 2019). Los estudios realizados en RILs derivadas de cruzamientos con anfidiploides simples o complejos evidenciaron que las mismas poseían niveles altos de resistencia a numerosos patógenos (García *et al.*, 1995, 1996; Stalker *et al.*, 1979; Stalker, 1984; Fávero, 2020). Esto es relevante para la población interespecífica de RILs aquí evaluada ya que se ha comprobado la introgresión efectiva de segmentos cromosómicos desde las tres especies silvestres en las diferentes RILs (Ver Cap V). En esta población ya se ha mostrado la existencia de RILs con resistencia a otros hongos patógenos del suelo (Rosso, com. pers.) y está siendo motivo de desarrollo de otra tesis doctoral. Sin embargo, aún es necesario extender las evaluaciones de resistencia a otros patógenos en esta población interespecífica de RILs ya que las especies silvestres utilizadas son resistentes a diversos patógenos fúngicos de suelo y foliares como roya (*Puccinia arachidis* Speg.), viruela temprana del maní (*Cercospora arachidicola* S. Hori.) viruela tardía del maní [*Cercosporidium paersonatum* (Berk. y M.A. Curtis) Deighton.] y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. y *Sclerotium rolfsii* Sacc.] (Stalker *et al.*, 2017; Rosso *et al.*, 2019).

### **Correlación entre los caracteres morfológicos y el carbón del maní**

La búsqueda de caracteres morfológicos que se correlacionen con la susceptibilidad al carbón del maní se realizó analizando la totalidad de los caracteres morfológicos considerados en este capítulo. Aunque se detectaron 20 correlaciones estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ) las mismas no presentaron valores con significancia biológica, lo

que indica que las correlaciones explican < 50% de la varianza de un carácter predicho por el otro. Aun así, las correlaciones positivas detectadas entre la incidencia al carbón del maní y las variables morfológicas vegetativas ( $r \approx 0,34$ ) y las morfológicas reproductivas ( $r \approx 0,31$ ) podrían adjudicarse a la correlación negativa y significativa que mostraron los genotipos con caracteres vegetativos y reproductivos de mayor tamaño y una fructificación más concentrada. Esta última condición, podría predisponer a una mayor cantidad de frutos a ser infectados por teliosporas de *T. frezii* en un período más acotado de tiempo, sin manifestar eventos de escape por la condición contrastante de dispersión. Aunque sin significancia biológica, estas tendencias son una primera aproximación a la información a utilizar en los criterios de selección en poblaciones interespecíficas para desarrollar variedades con una estructura morfológica que contribuya a la resistencia genética al carbón del maní.

## CONCLUSIÓN

Mediante la caracterización morfológica de la población interespecífica de RILs se identifica un set de caracteres morfológicos relevantes que permiten la caracterización fenotípica detallada de cada una de las líneas. La distribución de los caracteres en las RILs muestra una variación más amplia que la observada en los progenitores diploides y tetraploides, ampliando en gran medida la variabilidad disponible para incorporar a los planes de mejoramiento de variedades comerciales.

Las correlaciones positivas o negativas de las variables morfológicas con la incidencia al carbón del maní, aunque sin significancia biológica resultan interesantes y deberían ser consideradas en los programas de mejoramiento de variedades resistentes al carbón del maní. Más aún, el hecho de haber detectado 11 RILs resistentes (0% a 0,07% de incidencia de carbón) que pertenecen al grupo exomorfológico de *A. hypogaea* proporciona un material de premejoramiento con elevada compatibilidad para el cruzamiento con la especie cultivada, con bajo efecto de fondo genético esperado, y que portan segmentos introgressados para resistencia al carbón del maní.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, H., and Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4): 433-459.
- Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., and Johnson, D. V. (Eds.). (2015). *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools*. Springer International Publishing.
- Astiz Gassó, M., Leis, R., and Marinelli, A. D. (2008). Evaluación de incidencia y severidad del carbón de maní (*Thecaphora frezii*) en infecciones artificiales, sobre cultivares comerciales de maní. 1° Congreso Argentino de Fitopatología., 118.
- Balzarini, M., Bruno, C., Córdoba, M., and Teich, I. (2015). *Herramientas en el análisis estadístico multivariado*. Córdoba, Argentina.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., Starr, J. L., and Paterson, A. H. (2001). Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics*, 159(2): 823–837.
- Capello, G., and Dignani, D. (2014). Peanut smut chemical control and quantification of the kernel yield loss using incidence values as reference. (In spanish) (T. editor, Ed.; pp. 75–76). CIA Cabrera; INTA.
- Carvalho, M. A., and Quesenberry, K. H. (2009). Morphological characterization of the USA *Arachis pinto* Krap. and Greg. Collection. *Plant Systematics and Evolution*, 277(1-2): 1–11.
- Di Rienzo, J. A., Macchiavelli, R., and Casanoves, F. (2017). Modelos lineales generalizados mixtos aplicaciones en infostat.
- Fávero, A. P., Simpson, C. E., Valls, J. F., and Vello, N. A. (2006). Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Science*, 46(4): 1546-1552.
- Fávero, A. P., Custodio, A. R., Dinato, N. B., Godoy, I. J. D., Seijo, J. G., and Michelotto, M. D. (2020). Transference of multiple resistance to peanut through the development of cross-compatible complex hybrids of wild *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2).
- Foncéka, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M. N., Ndoye, O., Fávero, A. P., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2009). Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: A way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. *BMC Plant Biology*, 9(1): 103.
- Foncéka, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoye, O., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., and others. (2012). Fostered and left behind alleles in peanut: Interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. *BMC Plant Biology*, 12(1): 26.
- García, G. M., Stalker, H. T., and Kochert, G. (1995). Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome*, 38(1): 166-176.
- García, G. M., Stalker, H. T., Shroeder, E., and Kochert, G. (1996). Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome*, 39(5): 836-845.

- Hancock, W. G., Tallury, S. P., Isleib, T. G., Chu, Y., Ozias-Akins, P., and Stalker, H. T. (2019). Introgression Analysis and Morphological Characterization of an *Arachis hypogaea* × *A. diogenii* Interspecific Hybrid Derived Population. *Crop Science*, 59(2): 640-649.
- Hawkes, J. G., Maxted, N., and Ford-Lloyd, B. V. (2012). The ex situ conservation of plant genetic resources. Springer Science and Business Media.
- Holbrook, C. C., and Dong, W. (2005). Development and evaluation of a mini core collection for the US peanut germplasm collection. *Crop Science*, 45(4): 1540-1544.
- Holbrook, C. C., and Stalker, H. T. (2003). Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews*, 22, 297-356.
- Jelihovschi, E. G., Faria, J. C., and Allaman, I. B. (2014). ScottKnott: A package for performing the scott-knott clustering algorithm in r. *TEMA (São Carlos)*, 15(1): 3-17.
- Johnson, R. (1983). Genetic background of durable resistance. In *Durable resistance in crops* (pp. 5-26). Springer, Boston, MA.
- Knudson, C. (2018). An introduction to model-fitting with the r package glmm.
- Kumari, V., Gowda, M., Tasiwal, V., Pandey, M. K., Bhat, R. S., Mallikarjuna, N., Upadhyaya, H. D., and Varshney, R. K. (2014). Diversification of primary gene pool through introgression of resistance to foliar diseases from synthetic amphidiploids to cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Crop Journal*, 2(2-3): 110-119.
- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., and Araujo, A. C. G. (2017). Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. *American Journal of Botany*, 104(3): 379-388.
- Leal-Bertioli, S. C., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araujo, A. C., Silva, J. P., Cavalcante, U., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M., and others. (2015). *Arachis batizocoi*: A study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*, 115(2): 237-249.
- López-Santiago, J., Nieto-Ángel, R., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, E., Colinas-León, M. T., Borys, M. W., and González-Andrés, F. (2008). Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(2): 97-111.
- Nigam, S. (2014). Groundnut at a glance. ICRISAT, Patancheru. [Http://Oar. Icrisat. Org/8455](http://Oar.Icrisat.Org/8455), 121.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M. H. H., Oksanen, M. J., & Suggests, M. A. S. S. (2007). The vegan package. *Community ecology package*, 10(631-637), 719
- Rago, A. M., Cazon, L. I., Paredes, J. A., Molina, J. P. E., Conforto, E. C., Bisonard, E. M., and Oddino, C. (2017). Peanut smut: From an emerging disease to an actual threat to argentine peanut production. *Plant Disease*, 101(3): 400-408.
- Rieseberg, L. H., Archer, M. A., and Wayne, R. K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83(4): 363-372.
- Rosso, M.; Soave, S.; Soave, J.; De Blas, F.; Bressano, M.; Giordano, F.; Giuggia, J.; Garnero, J.M.; Seijo, G.; Moresi, A.; Buteler, M.; Oddino, C. (2019). Caracterización del germoplasma de criadero el Carmen frente a tizón del Maní causado por

- Sclerotinia minor*. Jornada Nacional de maní. 34. 02 de octubre 2019. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Royo Pallares, O. M. (1992). A Phenetic Investigation of Vicia Section Australes. Tesis Magister. School of Biological Sciences, University of Birmingham, U.K., 90 pp.
- Royo Pallares, O. M., A, T., and Seijo J. G. (2017). Cluster and principal component analysis of a morphological data set from herbarium specimens of *Arachis hypogaea* L. Originally collected in 9 countries at the centers of diversities in south and central America. 9th International Conference on Advances in *Arachis* Through Genomics and Biotechnology. Córdoba, Argentina, Del 14-17 de Marzo de 2017.
- Royo Pallares, O. M., Gioco, J. O., Pietrarelli, L., Vanni, R. O., Krapovickas, A., and Seijo, J. G. (2015). Análisis de componentes principales de descriptores cuali y cuantitativos de germoplasma de maní [*Arachis hypogaea* L.]. Jornada Nacional de maní. 30. 2015 09 17, 17 de Setiembre 2015. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Scott, A. J., and Knott, M. (1974). A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 507–512.
- Seijo J. G., Soave J. H., Baldesari J., Balzarini M., Oddino C., Royo O. M., De Blas. F. J., Moreno, V., Mamaní E, Burno C., Russo, G. L., Robledo G. R., Samoluk S., Chalup, L., and Pérez, L. (2019). Caracterización fenotípica de las colecciones argentinas de maní. XXXIV Jornada de Maní, Septiembre de 2019, Gral Cabrera, Córdoba, Argentina.
- Shannon, C. E., and Weaver, W. (1962). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press.
- Shirasawa, K. E. N. T. A., Bertioli, D. J., Varshney, R. K., Moretzsohn, M. C., Leal-Bertioli, S. C., Thudi, M. A. H. E. N. D. A. R., ... and Qin, H. O. N. G. D. E. (2013). Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. *DNA research*, 20(2): 173-184.
- Simpson, C. (2001). Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* l. *Peanut Science*, 28(2): 114–116.
- Simpson, C., and Starr, J. (2001). Registration of ‘COAN’ Peanut. *Crop Science*, 41(3): 918–918.
- Simpson, C., Starr, J., Church, G., Burow, M., and Paterson, A. (2003). Registration of ‘NemaTAM’peanut.(Registrations of cultivars). *Crop Science*, 43(4): 1561–1562.
- Skinner, D., Bauchan, G., Auricht, G., and Hughes, S. (1999). A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections. *Crop Science*, 39(4): 1237–1242.
- Stalker, H. T., and Wynne, J. C. (1979). Cytology of interspecific hybrids in section *Arachis* of peanuts. *Peanut Science*, 6(2): 110-114.
- Stalker, H. T. (1984). Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* leafspot resistance for peanut improvement. *Euphytica*, 33(2): 529-538.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57(3): 1102–1120.
- Starr, J. L., Schuster, G. L., and Simpson, C. E. (1990). Characterization of the resistance to *Meloidogyne arenaria* in an interspecific *Arachis* spp. hybrid. *Peanut Science*, 17(2): 106-108.



- Suassuna, T., Suassuna, N., Martins, K., Matos, R., Heuert, J., Bertioli, D., and Moretzsohn, M. (2020). Broadening the Variability for Peanut Breeding with a Wild Species-Derived Induced Allotetraploid. *Agronomy*, 10(12): 1917.
- Team, R. (2019). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing; 2011. URL <https://www.R-project.org>.
- Upadhyaya, H., Ferguson, M., and Bramel, P. (2001). Status of the *Arachis* germplasm collection at icrisat. *Peanut Science*, 28(2): 89–96.
- Upadhyaya, H. D., Ortiz, R., Bramel, P. J., and Singh, S. (2003). Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(2): 139-148.
- Vishwakarma, M. K., Kale, S. M., Sriswathi, M., Naresh, T., Shasidhar, Y., Garg, V. and Varshney, R. K. (2017). Genome-wide discovery and deployment of insertions and deletions markers provided greater insights on species, genomes, and sections relationships in the genus *Arachis*. *Frontiers in plant science*, 8, 2064.
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., and Zemla, J. (2017). Package “corrplot”. *Statistician*, 56(316): e24.
- Wynne, J. C., and Gregory, W. C. (1981). Peanut breeding. In *Advances in agronomy* (Vol. 34, pp. 39-72). Academic Press.

## CAPITULO IV

# CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PROXIMAL Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

### INTRODUCCIÓN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) contiene importantes componentes para la nutrición humana. La sobresaliente calidad nutricional de este grano se debe al alto contenido de proteínas y a la alta digestibilidad de sus aceites (Venkatachalam y Sathe; 2006). Asimismo, contiene hidratos de carbono, fibra dietaria y presenta diversos compuestos biológicamente activos tales como tocoferoles, flavonoides, fitoesteroles y resveratrol (Arya *et al.*, 2016; Grosso *et al.*, 2000; Settaluri *et al.*, 2012; Tuberoso *et al.*, 2007; Venkatachalam y Sathe; 2006).

Las fuentes de proteína más conocidas son las carnes, huevos y productos lácteos, pero además de estos alimentos, las legumbres tales como porotos, arvejas y maní contienen cantidades notables de proteínas digeribles para el ser humano (Settaluri *et al.*, 2012). El cuerpo humano requiere 20 aminoácidos para crecer y desarrollarse normalmente (Schaafsma *et al.*, 2000); y de esos 20 aminoácidos, 11 son sintetizados en el cuerpo. Los 9 restantes deben ser incorporados en la dieta diaria y son llamados esenciales (Settaluri *et al.*, 2012). Las proteínas que contienen los 20 aminoácidos son consideradas proteínas completas, tales como la caseína (proteína presente en la leche animal) y albúminas (proteínas en la clara del huevo) (Settaluri *et al.*, 2012). El maní es una fuente vegetal de estas proteínas que contienen todos los aminoácidos esenciales para el cuerpo humano (Hoffman *et al.*, 2004), presentándolas en una mayor proporción que cualquier otra legumbre o nuez (Food Composition NAL-USDA, 2019).

De los hidratos de carbono presentes en el maní, la mayor cantidad corresponde al almidón, que es un homopolisacárido constituido por residuos de  $\alpha$ -D glucosa unidos por enlaces glicosídicos (Settaluri *et al.*, 2012). El almidón sometido a la degradación enzimática por la acción de la amilasa, es inicialmente degradado a maltosa e isomaltosa (Zeeman *et al.*, 2010). Estos disacáridos bajo la acción de respectivas acciones enzimáticas

se convierten en glucosa que es la fuente de energía básica del metabolismo oxidativo en el cuerpo humano (El Bacha *et al.*, 2010). El maní tostado contiene 21,51% de carbohidratos (USDA, NNDSSR, 2011; Pattee *et al.*, 2000; Settaluri *et al.*, 2012), por lo que aporta el 15% de la cantidad diaria recomendada de carbohidratos nutricionales por porción de 100 g (Settaluri *et al.*, 2012).

La fibra dietaria del maní es principalmente insoluble, con pequeñas cantidades de fibra soluble (Higgs, 2003). Hasta el momento, no hay información que la fibra insoluble en el maní participe en la captura de nutrientes o en la restricción de la absorción de los mismos (Arya *et al.*, 2016); y de hecho, la pequeña cantidad de fibra soluble fermentable podría mejorar la absorción de algunos minerales (Greger, 1999).

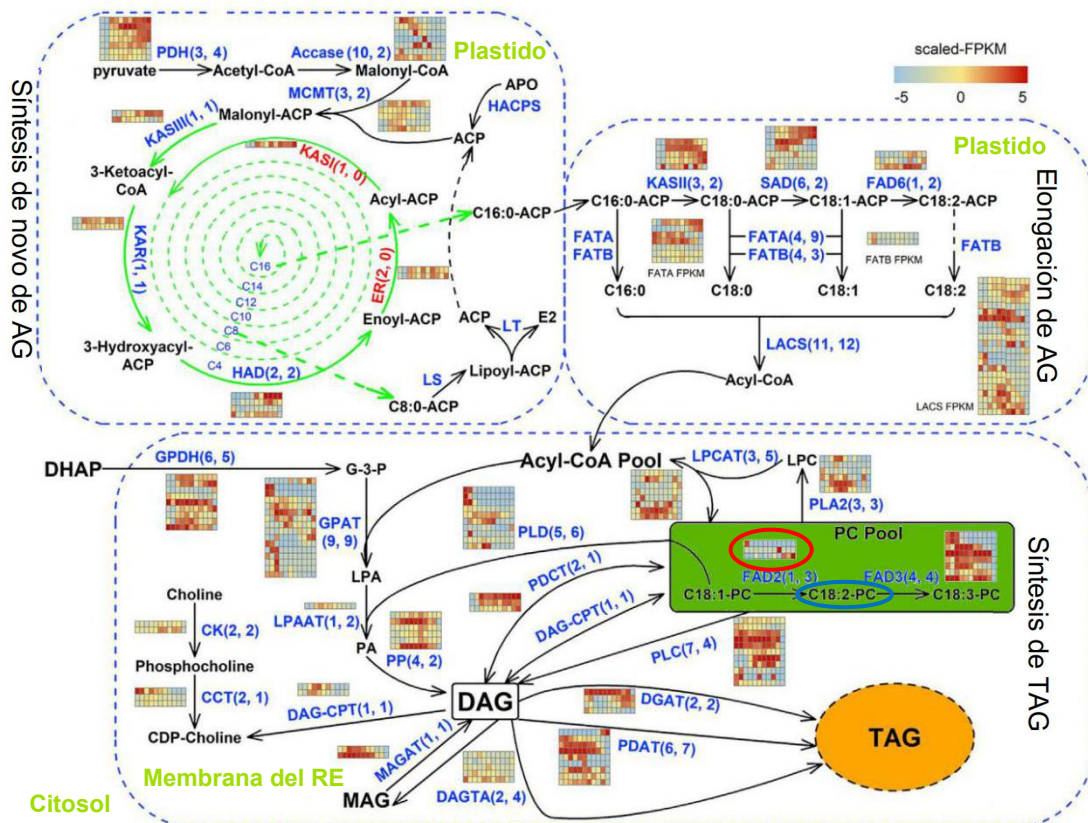
Las variedades de maní tradicional contienen entre el 50-55% de grasas, del cual aproximadamente el 30% es ácido linoléico y el 45% es ácido oleico (Arya *et al.*, 2016; Grosso *et al.*, 2000; Settaluri *et al.*, 2012). Tanto el contenido de aceite como la relación de los ácidos grasos son los caracteres nutricionales más importantes para la industria y comercialización del maní, habiéndose desarrollado un amplio espectro de investigaciones sobre estos componentes. El aceite de maní está compuesto principalmente por triacilglicerol (TAG) que proveen nutrientes importantes para la salud humana (Chen *et al.*, 2019). Del total de los TAG, el ácido oleico y linoléico constituyen el 80% (Moore y Knauff, 1989).

Como consecuencia de la oxidación del ácido linoléico, en las variedades tradicionales se desarrolla rancidez y sabores desagradables en cortos periodos de estacionamiento de los granos. Por esta razón, desde hace unas tres décadas, la tendencia a nivel mundial fue aumentar la proporción del ácido oleico con respecto al linoléico, para mitigar el efecto de la oxidación y mantener la calidad nutricional durante periodos de estacionamiento más largos (Isleib *et al.*, 2006). Argentina fue uno de los países pioneros en el desarrollo y adopción de variedades alto oleico (Soave, com. pers.; CAM, 2015), característica que le permitió al país posicionarse como uno de los principales exportadores de maní de alta calidad para confitería (CAM, 2015; Grosso, 2020).

Por esta razón, gran parte de los estudios de calidad de los aceites de maní, se centran en la relación oleico/linoléico (O/L) ya que junto a los valores de iodo, son indicadores de la estabilidad de la calidad del grano en caja y del aceite obtenido en los procesos industriales (Ahmed y Young, 1982; Grosso *et al.*, 2000). El valor de iodo (V.I.) es una

medida del grado relativo de insaturación de los ácidos grasos que componen el aceite (Sanders, 2002). Dado que el punto de fusión y la estabilidad oxidativa están relacionadas con el nivel de insaturaciones, el V.I. provee una estimación de esos factores de calidad. Un mayor V.I. indica mayor insaturación y mayor susceptibilidad a la oxidación. El aceite de maní (V.I. 82–107) es más saturado que los aceites de maíz (V.I. 103–128), algodón (V.I. 99–113), lino (V.I. 155–205), pero considerablemente más insaturado que el aceite de coco (V.I. 7.7–10.5), palma (V.I. 44–54) o manteca (V.I. 25–42) (Sanders, 2002).

La relación de los ácidos oleico/linoléico depende de la acción de la enzima  $\Delta 12$  ácido-graso desaturasa (FAD2, por sus siglas en inglés) que actúa desaturando el ácido oleico 18:1 para generar ácido linoléico 18:2 en la membrana del retículo endoplasmático (Teixeira *et al.*, 2009) (Figura 4.1). Esta enzima FAD2 está codificada por los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B*, que son homeólogos de los genomas A y B, respectivamente, del maní cultivado. Los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B* se expresan a niveles basales durante el desarrollo del grano de maní, pero la expresión de estos genes se activa significativamente en el proceso de maduración del mismo (Chen *et al.*, 2019).



**Fig. 4.1** Vía metabólica de los ácidos grasos en maní (*Arachis hypogaea*) adaptado de Chen *et al.* (2019). El recuadro en verde muestra el grupo de la fosfatidilcolina con la enzima FAD2 resaltada con un ovalo azul. El proceso se produce en la membrana del retículo endoplasmático (RE) finalizando con la acumulación de triacilgliceroles (TAG). Las cuadrículas con coloración del gris al rojo, muestran el nivel de expresión del gen que codifica la enzima indicada con color celeste. La cuadrícula resaltada con un ovalo rojo, muestra los niveles de expresión del gen *AhFAD2*. La expresión de los genes medida por la cantidad de transcritos en once estados del desarrollo de la semilla se indica según la escala FPKM ubicada arriba a la derecha: el color rojo indica elevada expresión y el gris sub expresión.

Si bien la relación entre estos dos ácidos puede ser afectada por el lugar geográfico en donde se desarrolla el cultivo (Grosso *et al.*, 1994), la temperatura del suelo (Golombek *et al.*, 1995), la temperatura atmosférica, la pluviometría (Casini *et al.*, 2003) y el estado de madurez del grano (Chen *et al.*, 2019), son las mutaciones recesivas que ocurren en el gen *AhFAD2*, las que producen cambios significativos y estables en la relación. La sustitución de un nucleótido (G:C → A:T) del gen *AhFAD2A* y una inserción de “A” en el gen *AhFAD2B* inhiben la acción de esta enzima en los subgenomas A y B. Estas mutaciones recesivas en homocigosis producen el fenotipo alto oleico (AO) (Zhao *et al.*, 2017); mientras que la condición *wild type* (WT) que resulta en un fenotipo no AO o normal. Si bien se han descrito algunos fenotipos AO causados por otros genes mutantes (M2-225 y Mycogen-Flavo) generados por inducción química de mutagénesis (Ashri, 1988), la selección comercial del carácter se realizó, hasta el momento, sobre las dos mutaciones espontáneas de *AhFAD2*.

Se han desarrollado diversos métodos para la detección de genotipos homocigotas para las mutaciones en los genes *AhFAD2*, entre ellos la utilización de marcadores, basados en la amplificación de fragmentos digeridos con enzimas que actúan en sitios de restricción específicos (CAPS, por sus siglas en inglés) permitiendo detectar la modificación en el tamaño del fragmento cuando la mutación está presente (Chu *et al.*, 2009), por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR, por sus siglas en inglés) (Barkley *et al.*, 2010; Barkley *et al.*, 2011) y por PCR de alelos específicos (AS-PCR, por sus siglas en inglés) (Chen *et al.*, 2010). Más recientemente, se ha empleado

un método basado en la amplificación competitiva de fragmentos de ADN (KASP, por sus siglas en inglés) con cebadores específicos de alelo marcados con fluoróforos HEX y FAM en el extremo 5'. En esta técnica los genotipos son detectados mediante la interpretación de las intensidades de las señales fluorescentes. Otro método específico para detectar los genotipos de *AhFAD2A* y *AhFAD2B* fue desarrollado por (Zhao *et al.*, 2017) para usarse sobre conjuntos de genotipos que provienen de diversos cruzamientos. Aunque los dos últimos métodos mencionados son efectivos en la detección de las variantes alélicas que producen la variabilidad en la relación O/L, la complejidad que presentan tanto en la técnica como en el análisis los hace de más difícil aplicación en el mejoramiento asistido por marcadores de variedades de maní AO. Es por esto, que el método desarrollado por (Chen *et al.*, 2010), basado en la detección de las variantes alélicas de los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B* por PCR es el más utilizado en la actualidad en planes de mejoramiento ya que permite identificar de manera relativamente sencilla las variantes del gen mediante cebadores alelo específicos alterando la temperatura de *annealing*.

Como se dijo, el desarrollo de las variedades AO desde el 2005 le ha permitido a la Argentina posicionarse, como uno de los líderes en la exportación de este tipo de maní a partir del 2011 (Soave com. pers.; CAM, 2015; Grosso, 2020). En consecuencia, el mantenimiento de este carácter, junto a los otros caracteres nutricionales, en las nuevas variedades que se desarrollen es de vital importancia para mantener la posición exportadora del país. En este contexto, el uso de razas locales más distantes de los tipos comerciales, así como de especies silvestres para la introgresión de caracteres tales como resistencia a enfermedades a los cultivares comerciales de maní, debe ir acompañado del mantenimiento de la calidad nutricional de los granos. Se ha citado que el uso de especies silvestres en planes de mejoramiento del maní puede tener una correlación negativa con el rendimiento y la calidad del grano (Holbrook y Stalker, 2003). No obstante, hay muy poca información disponible sobre la composición química de los granos en las especies silvestres (Grosso *et al.*, 2000) y sobre cómo estos caracteres pueden afectar la cantidad y composición de los granos en poblaciones de mejoramiento derivadas de especies silvestres. En particular, aún no hay datos en poblaciones que no hayan sido seleccionadas previamente para otros caracteres, como resistencias a enfermedades o sequía, en las cuales los resultados publicados podrían haber estado sesgados por los criterios de selección aplicados.

Por lo expuesto, los objetivos del presente capítulo son a) analizar la composición química proximal y de ácidos grasos de una población interespecífica de RILs del género *Arachis*, sus progenitores *A. hypogaea* y el anfidiplóide así como de las especies silvestres que le dieron origen a este último; b) realizar la caracterización genotípica de la población interespecífica de RILs para los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B* mediante cebadores alelo específico y c) analizar el patrón de la segregación del carácter fenotípico AO en la población de RILs.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se utilizaron semillas sanas de las 103 líneas pertenecientes a una población interespecífica de RILs detallada en el capítulo II. Se incluyeron también las semillas de los progenitores de la población interespecífica de RILs y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide. Las semillas de la población interespecífica de las RILs se cosecharon durante tres años (generaciones F<sub>7</sub> a F<sub>9</sub>). Las semillas de las especies silvestres y el anfidiplóide se cosecharon en el año 2019. Las parcelas de estas accesiones son permanentes y la cosecha corresponde a una muestra al azar de todas las plantas presentes en la parcela experimental. En cada año, la cosecha de todos los genotipos se realizó a principios de abril, antes de las primeras heladas. Las semillas cosechadas se conservaron a -20 °C hasta su evaluación.

### **Determinación del contenido de humedad, grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales**

La muestra de cada genotipo estuvo compuesta por tres submuestras de cada cosecha (desde 2015 a 2017) con todas las repeticiones incluidas, completando 60 g en total. Las muestras de las especies silvestres y del anfidiplóide estuvieron compuestas por 10 g de semillas cosechadas de cada parcela experimental. Las muestras de cada genotipo fueron evaluadas por humedad, grasa, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales.

Los seis parámetros mencionados se evaluaron en las RILs, las especies silvestres y el anfidiplóide mediante la utilización de un equipo NIRS Modelo DA 1650, con un detector 256 pixel InGaAs diodo de array y una resolución espectral de 0,5 nm a 2,0 nm/punto de datos a una longitud de onda 1100 – 1650 nm (FOSS, Hilleroed, Denmark). Dado que el equipo NIRS estaba calibrado para muestras de maní comercial tipo rastrero (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*), se efectuaron mediciones de control con métodos de referencia para los parámetros de contenido de grasas totales y proteínas. Las mediciones de control se realizaron en aquellas RILs con valores fuera de rango ( $\pm 15\%$  de los valores medios esperados de grasas totales y proteínas) para maní tipo rastrero. Asimismo, debido a la diferencia de calibre y coloración de la testa (factores que influyen en la exactitud de la medición del equipo NIRS), las especies silvestres y el anfidiplóide se midieron, también por los métodos de referencia para determinar cenizas, humedad, grasas y proteínas según se consigna a continuación.

## **Humedad**

Para expresar todos los parámetros proximales sobre base seca, se determinó la humedad en 1 g de semillas frescas de cada muestra compuesta de cada genotipo, con tres réplicas experimentales. Las muestras fueron molidas y secadas en estufa con forzador de aire a 130 °C por 2 horas. El peso de la muestra seca se midió en una balanza analítica Modelo AS220R2 (RADWAG Radom, Polonia) y se determinó el porcentaje de humedad de la muestra mediante la ecuación 4.1:

### **Ecuación 4.1**

$$\%Humedad = \frac{Peso\ fresco - Peso\ seco}{Peso\ fresco} \times 100$$

## **Grasas totales**

El contenido de grasas totales se determinó en un 1 g de semillas frescas molidas de cada muestra compuesta de cada genotipo, con tres réplicas. Las muestras se colocaron en cartuchos de papel de filtro de 73 g m<sup>-2</sup> y 0,170 mm de espesor. Las mismas fueron secadas en estufa con forzador de aire a 130 °C por 2 horas. La extracción de grasas totales se



realizó por 16 horas con hexano a 30-60 °C con ciclos de sifón cada 1,5 h aprox. en un aparato de Soxhlet. Las grasas totales extraídas fueron separadas del solvente bajo presión reducida en un evaporador rotatorio por aproximadamente 5 min. El porcentaje de grasas totales se determinó mediante la ecuación 4.2 registrando la diferencia de peso entre las muestras secas antes de la extracción de grasas en Soxhlet y el peso de la muestra seca deslipidizada. El peso se midió en una balanza analítica Modelo AS220R2 (RADWAG Radom, Polonia).

#### **Ecuación 4.2**

$$\% \text{Grasas totales sobre materia seca} = \frac{\text{Peso seco} - \text{Peso muestra deslipidizada}}{\text{Peso fresco} \times (100 - \text{Humedad})} \times 100$$

#### **Proteínas**

El porcentaje de proteínas fue calculado mediante la determinación del contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, y luego convertido a porcentaje de proteínas mediante el factor de conversión 5,46 usado para muestras sólidas (Young y Hammons, 1973) según la ecuación 4.3.

#### **Ecuación 4.3**

$$\% \text{Proteínas sobre materia seca} = \frac{\text{Volumen de SO}_4\text{H}_2 \times \text{N de H}_3\text{BO}_3 \times 1,4007}{\text{Peso fresco} \times (100 - \text{Humedad})} \times 5,46.$$

En el numerador se indica el producto del volumen de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> utilizado para la titulación por la normalidad del ácido bórico (0.1 N) y por 1,4007; este último es un factor simple que tiene en cuenta el peso molecular del nitrógeno, la conversión de los miliequivalentes resultantes del producto Volumen de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> × N de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y la conversión a porcentaje del resultado del numerador.

#### **Cenizas**

Para determinar el contenido de cenizas se pesó una muestra fresca de 0,5 g de semillas frescas molidas de cada muestra compuesta de cada genotipo, con tres réplicas. Siguiendo el método de AOAC, (1980), cada muestra húmeda se colocó en un crisol seco

de peso conocido y las mismas se incineraron en mufla a 550 °C por 5 h. Luego de la incineración se registró el peso del crisol más las cenizas. La determinación del contenido de cenizas se realizó mediante la ecuación 4.4.

#### **Ecuación 4.4**

$$\% \text{Cenizas sobre materia seca} = \frac{\text{Peso del crisol seco} - (\text{Peso del crisol} + \text{Cenizas})}{\text{Peso fresco} \times (100 - \text{Humedad})} \times 100$$

### **Composición de ácidos grasos**

Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron preparados por transesterificación con una solución al 3% de ácido sulfúrico en metanol, siguiendo el método descrito por Jellum y Worthington, (1966). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de las grasas totales se analizaron con un cromatógrafo de gases Clarus 600 (Perkin-Elmer®) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se usó una columna capilar AT-Wax superox II (Alltech, Deerfield, IL) de 30 m × 0.25 mm d.i. La temperatura de la columna fue programada a 180 °C (temperatura mantenida por 10 min) a 250 °C (4 °C min<sup>-1</sup>). La temperatura del inyector fue programada a 250 °C. El flujo de la fase móvil (nitrógeno) fue de 1 mL min<sup>-1</sup>. Los EMAG separados fueron identificados comparando el tiempo de retención con los estándares de Sigma Chemical Co. El análisis cuantitativo de los ácidos grasos fue realizado usando el éster metílico heptadecanoico como estándar interno (Grosso *et al.*, 2000). Todos los valores fueron expresados como el total del área bajo la curva (Dain *et al.*, 2016) y se estimó la relación oleico/linoléico (O/L) mediante la ecuación 4.5.

#### **Ecuación 4.5**

$$\text{Relación oléico/linoléico} = \frac{\text{contenido \% de ácido oléico}}{\text{contenido \% de ácido linoléico}}$$

### **Valores de iodo**

Los valores de iodo (VI) se calcularon a partir de la composición de ácidos grasos (Hashim *et al.*, 1993) usando la ecuación 4.6.

#### **Ecuación 4.6**

$$VI = (\% \text{ oléico} \times 0,8601) + (\% \text{ linoléico} \times 1,7321) \\ + (\% \text{ eicosenóico} \times 0,7854)$$

## **Caracterización genotípica de los materiales para los genes *AhFAD2* por AS-PCR**

El ADN genómico de todas las RILs, sus progenitores y los controles [Granoleico (AO), *A. cardenasii* y *A. ipaënsis* (WT)] se extrajo según se describe en el capítulo V de esta tesis. Para detectar mediante PCR el estado (mutante o WT) de los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B*, se utilizaron los cebadores F435Fw, F435IC-Rv (Chen *et al.*, 2010), como controles de amplificación, en combinación con los cebadores F435Wt-Rv, F435subs-Rv, F435ins-Rv (Chen *et al.*, 2010) (Tabla 4.1), que amplifican los segmentos donde se ubica la secuencia WT, la sustitución y la inserción, respectivamente. Las condiciones del termociclado y los componentes de reacción utilizados fueron las propuestas por Chen *et al.*, (2010). En cada reacción se utilizaron tres cebadores (un *forward* de control, un *forward* alelo específico y un *reverse* en común) para generar un amplicón de control y un amplicón alelo específico, respectivamente. Se usaron 20 ng de ADN genómico como molde para cada reacción en un volumen total de 10µL con una concentración final de 1× *buffer* de PCR, 0.5µM de cebador *forward*, 0.05µM de cebador control *reverse*, 0.45 µM de cebador *reverse* alelo específico (dependiendo del amplicón objetivo: WT, inserción o delección), 0.25 mM de dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.05 U/µL Taq polimerasa Pegasus (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina). Todas las PCR se realizaron usando un programa para desnaturalización del ADN a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 1 min. Las temperaturas de *annealing* variaron entre 63°C a 66°C (dependiendo del amplicón objetivo, ver tabla 4.1) por 1 min. La temperatura de extensión fue de 72°C por 10 min. Finalmente, los productos de la reacción se conservaron a 4°C. Todas las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador MasterCycler Thermal Cycler modelo 5333 (Eppendorf Hamburgo, Alemania).

Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida-bisacrilamida al 15% en 1× *buffer* Tris-Glicina por electroforesis a 70V por 1 h y se visualizaron bajo luz UV previa tinción con bromuro de etidio. Para documentar los geles con los patrones electroforéticos obtenidos, se utilizó el sistema de captura y análisis DigiDoc-It UVP (Analytik Jena US LLC. Upland, CA). Los fragmentos amplificados fueron analizados y

medidos (en pb) mediante el programa Peak Scanner™ Software 1.0 (© Copyright 2006. Applied Biosystems).

**Tabla 4.1** Cebadores utilizados en las PCR según Chen *et al.*, 2010 para la caracterización de las mutaciones de los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B*.

Cebador	Secuencia 5' to 3'	Temp (°C) <i>Annealing</i>	Tamaño esperado (bp)
F435-F	ATCCAAGGCTGCATTCTCAC	Según el par de	250
F435IC-R	CTCCCTGGTGGATTGTTTCATGT	primer R utilizado	
F435WT-R	ACTTCGTCGCGGTCTG	63	193
F435SUB-R	TGGGACAAACACTTCGTT	64	203
F435INS-R	AACACTTCGTCGCGGTCT	66	195

Los fragmentos amplificados en pares de bases fueron transformados a 1 = presencia del fragmento ó 0 = ausencia del fragmento para luego estimar los genotipos posibles de todos los individuos evaluados. A partir de los datos genotípicos obtenidos se estimaron los genotipos probables. Los alelos de cada loci se codificaron de la siguiente manera:  $O_1$  y  $O_2$  para los alelos *wild type* en los subnomas A y B, respectivamente, y  $o_1$  y  $o_2$  para los alelos mutantes en el genoma A y B, respectivamente ver Tabla 4.2.

Dado que los primers utilizados no permiten distinguir los alelos WT de los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B*, solo los genotipos doble homocigota ( $O_1O_1O_2O_2$  y  $o_1o_1o_2o_2$  que corresponden a fenotipos *wild type* y AO, respectivamente) pudieron ser claramente identificados por el patrón de bandas. Todos los demás genotipos fueron asignados a un conjunto de genotipos posibles según la amplificación de las bandas alelo específicas. En los casos en que amplificaron tanto la banda WT como la de sustitución, sin amplificación de la banda de inserción, esas RILs se asignaron a dos genotipos probables:  $O_1o_1/O_2O_2$  o  $o_1o_1/O_2O_2$ , sin poder discriminar entre el estado homocigota recesivo / heterocigota del gen *FAD2A*. De manera similar, las RILs con amplificaciones de la banda WT y la de inserción, sin amplificación de la banda de sustitución, fueron asignadas a dos genotipos probables:  $O_1O_1/O_2o_2$  o  $O_1O_1/o_2o_2$  sin poder discriminar entre los homocigotas recesivos / heterocigotas para el gen *FAD2B*.

En los casos que amplificaron las tres bandas, es decir la correspondiente a WT(Ol<sub>1</sub>/Ol<sub>2</sub>), a la de sustitución (ol<sub>1</sub>) y a la de inserción (ol<sub>2</sub>) en la misma muestra, los genotipos posibles de estas RILs fueron los siguientes: Ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>/ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>, Ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>/Ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>, ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>/Ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>. Es decir, estas RILs poseían al menos un alelo mutante en cada loci, pero la técnica no permitió determinar si estaban en homocigosis o heterocigosis, debido a la amplificación del alelo WT no discrimina entre *loci*.

**Tabla 4.2** Recodificación de la amplificación de los cebadores F435Fw, F435IC-Rv, F435Wt-Rv, F435subs-Rv y F435ins-Rv en una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: *A. hypogaea* y anfidiplóide, las especies silvestres diploides de control (*A. cardenasii* y *A. ipaënsis*) y la línea comercial Granoleico (AO) La simbología Ol<sub>1</sub> y Ol<sub>2</sub> indica los alelos *wild type* en el genoma A y B, respectivamente y ol<sub>1</sub> y ol<sub>2</sub> indica los alelos mutados en el genoma A y B, respectivamente. La recodificación simplifica la visualización de los genotipos de la siguiente manera: dhwt = doble homocigota *wild type*, dhmut = doble homocigota mutante, dmndh = doble mutante no doble homocigota, smsushm/ht = Simple mutante para sustitución homocigota o heterocigota, sminshm/ht = Simple mutante para inserción homocigota o heterocigota.

WT	Sustitución	Inserción	Recodificación	Genotipo probable
1	0	0	dhwt	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>
0	1	1	dhmut	ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>
1	1	1	dmndh	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>
1	1	0	smsushm/ht	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>
1	0	1	sminshm/ht	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>

hm: homocigota; ht: heterocigota

### Análisis estadístico

Las medias de los componentes químicos proximales (grasas totales, proteínas cenizas, fibras y azúcares totales) de cada genotipo analizado se compararon usando el procedimiento de agrupamiento y comparación de medias Scott and Knott ( $\alpha = 0,05$ ) (Scott y Knott, 1974) basado en ANAVA mediante el paquete de R “ScottKnott” (Jelihovschi *et al.*, 2014).

Con los datos de composición de ácidos grasos se realizó un análisis de conglomerados a partir de una matriz de distancias euclídeas entre las RILs, sus progenitores y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide, utilizando el método Ward para la construcción de los clústeres jerárquicos. Con la misma matriz de datos se realizó un análisis de componentes principales utilizando el paquete “stats” del software (R Team, 2019) y un análisis de correlaciones fenotípicas ( $\alpha = 0,05$ ) entre los caracteres químicos de la población interespecífica de RILs y la incidencia al carbón del maní del capítulo III. Las correlaciones se calcularon con el paquete “corrplot” de R (Wei *et al.*, 2017) del software R (Team, 2019). Se consideraron como correlaciones con significancia biológica aquellas que tuvieron un valor absoluto superior a 0,71 (Skinner *et al.*, 1999). Las correlaciones consideradas de esta manera explican más del 50% de la varianza de un carácter predicho por el otro.

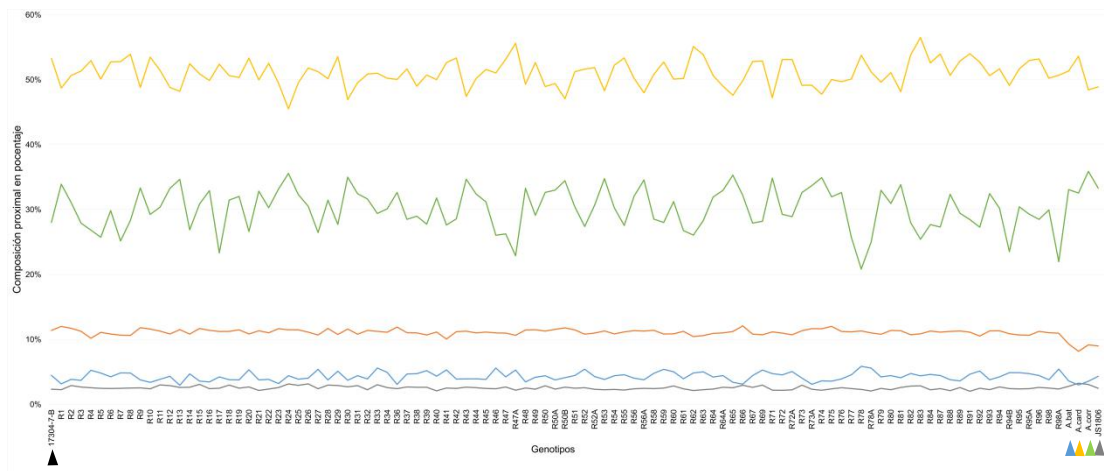
Los datos de contenido de ácido oleico (18:1) se utilizaron para realizar un análisis de la segregación fenotípica del carácter AO vs. normal. La condición AO se consideró cuando los valores en porcentaje del mismo fueron iguales o mayores al 70% y la condición normal cuando los valores fueron menores al 70% (Moore y Knauff, 1989). El análisis del efecto genotípico de las variantes alélicas para el gen *AhFAD2* en los genotipos con al menos un alelo WT no doble homocigota recesivo se realizó considerando RILs con fenotipo AO y con semillas inmaduras dado que el porcentaje de AO puede variar con el grado de madurez de los granos. Para esto, se contabilizaron las semillas inmaduras y se realizó un test de diferencias de proporciones ( $\alpha = 0.05$ ). Con los datos obtenidos se realizó un test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar la bondad del ajuste de las frecuencias de segregación esperadas (15:1) para el carácter fenotípico ( $\alpha = 0.05$ ) correspondiente a dos loci con dos alelos cada uno con dominancia completa en vías de expresión independientes (Moore y Knauff 1989). Del mismo modo con los datos genotípicos se realizó un test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar la bondad del ajuste de las frecuencias de segregación genotípica esperada (1:14:1) para los genotipos homocigota WT, cualquier otro genotipo no doble homocigotas recesivos y homocigota mutante, respectivamente ( $\alpha = 0.05$ ) (Moore y Knauff 1989). Finalmente, se estimaron las medias de los porcentajes de ácido oleico (18:1) y linoléico (18:2) de los grupos de genotipos detectados para confirmar la concordancia entre los genotipos amplificadas y los niveles de ácido oleico (18:1) y

linoléico (18:2) esperados. Los comandos utilizados en R se encuentran en el Anexo Script R.

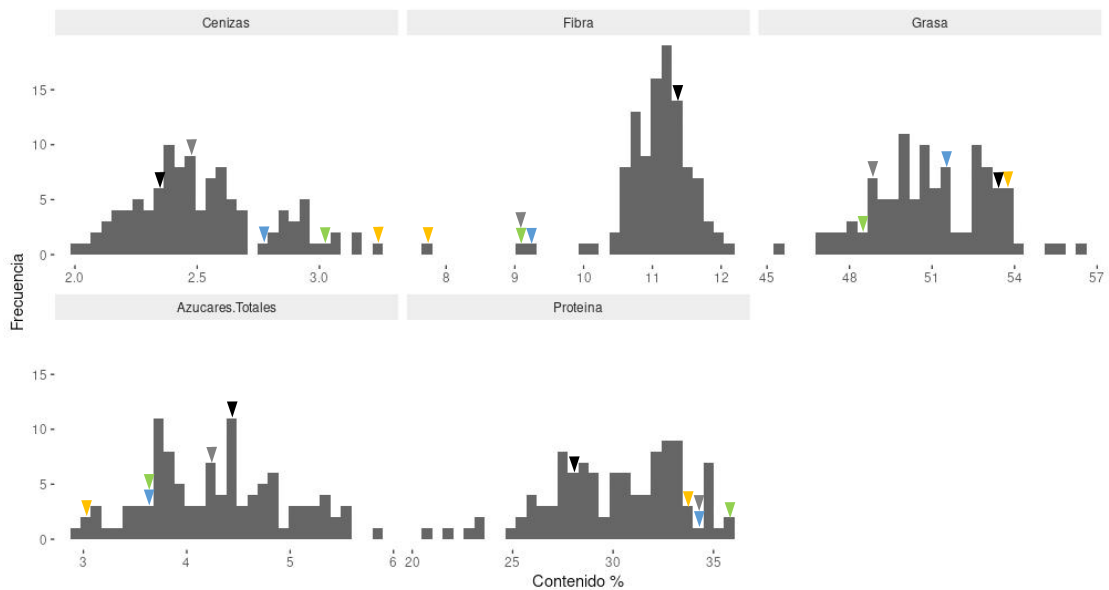
## RESULTADOS

### Determinación del contenido de grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales

Los valores de composición química proximal de grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales en los distintos genotipos analizados se visualizan en la Figura 4.2 y Anexo 4.1 representando a las RILs de mayor a menor según su número en la población. Las distribuciones de los valores químicos proximales individuales se ajustaron, en general, a una distribución normal (Figura 4.3).



**Fig. 4.2** Variación de la composición química proximal de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. Eje y = valores composicionales en porcentaje, eje X conjunto de genotipos analizados. Los colores indican los compuestos medidos: gris = cenizas, azul = azúcares totales, anaranjado = fibras, verde = proteínas y amarillo = grasas. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.



**Fig. 4.3** Histogramas de la distribución de los valores de composición química proximal de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.

El conjunto de genotipos analizados mostró un amplio rango de variación para todos los parámetros químicos medidos (Figura 4.3). En todos los casos se observó segregación transgresiva para los valores los progenitores de la población interespecífica de RILs.

### Grasas totales

El rango de variación del contenido de grasas totales en los genotipos analizados fue de 45,49% a 56,48%. Se identificaron siete grupos de genotipos (A, B, C, D, E, F y G) con diferentes medias estadísticamente significativas (Figura 4.4 A). Los genotipos del grupo G mostraron los valores máximos de contenido de grasas totales y no mostraron diferencias significativas entre ellos con una media de 56%. Este grupo estuvo integrado exclusivamente por RILs. Los genotipos del grupo A, todos pertenecientes a RILs, presentaron los valores mínimos de contenido de grasas totales con una media de 47%. Los



progenitores y las especies silvestres que dieron origen al progenitor anfidiplóide se ubicaron en los grupos con valores intermedios; *A. correntina* y el anfidiplóide integraron el grupo B que tiene una media de 49%, *A. batizocoi* se ubicó en el grupo D que tiene una media de 52%. Finalmente, *A. cardenasii* y el progenitor cultivado se ubicaron en el grupo F que tiene una media de 54% (Figura 4.4 A).

### **Proteínas**

El rango de variación del contenido de proteínas fue de 21% a 36%. Todas las especies silvestres y el anfidiplóide presentaron valores significativamente mayores de proteínas que el progenitor cultivado. Los valores obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos formando 8 grupos (A, B, C, D, E, F, G y H) (Figura 4.4 B). El grupo H mostró los valores máximos de proteínas con una media = 35%, e incluyó a la especie silvestre *A. correntina*. Los genotipos del grupo A presentaron los valores mínimos de contenido de proteínas con una media de 22%. El anfidiplóide se ubicó junto con *A. batizocoi* en el grupo G con una media de 33%, *A. cardenasii* en el grupo F con una media de 32 %; y el progenitor cultivado en el grupo D con una media de 29% (Figura 4.4 B).

### **Cenizas**

El rango de variación del contenido de cenizas fue desde 2% a 3%. El contenido de cenizas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos formando cuatro grupos (A, B, C y D) (Figura 4.4 C). Los genotipos del grupo D, entre ellos las especies silvestres *A. cardenasii* y *A. correntina* mostraron los valores máximos de cenizas con una media de 3%. El grupo A presentó los valores mínimos de contenido de cenizas con una media de 2%, e incluyó al progenitor cultivado. *A. batizocoi* se ubicó en el grupo C con una media de 3% y el anfidiplóide en el grupo B con una media de 2 (Figura 4.4 C).

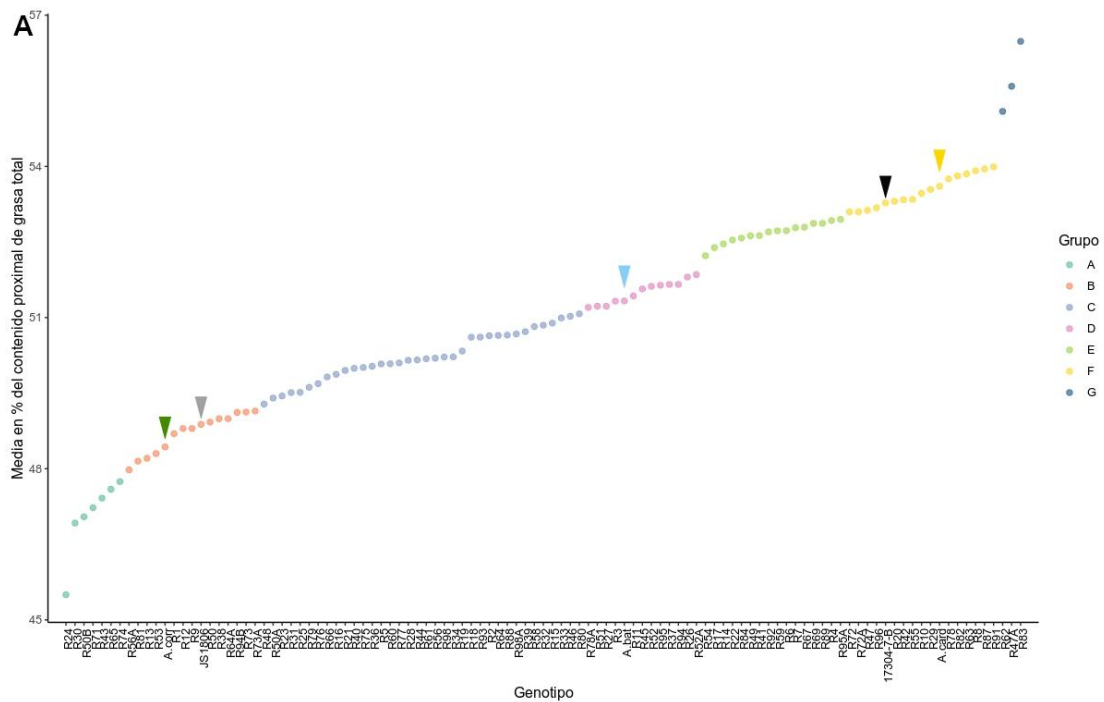
### **Fibras**

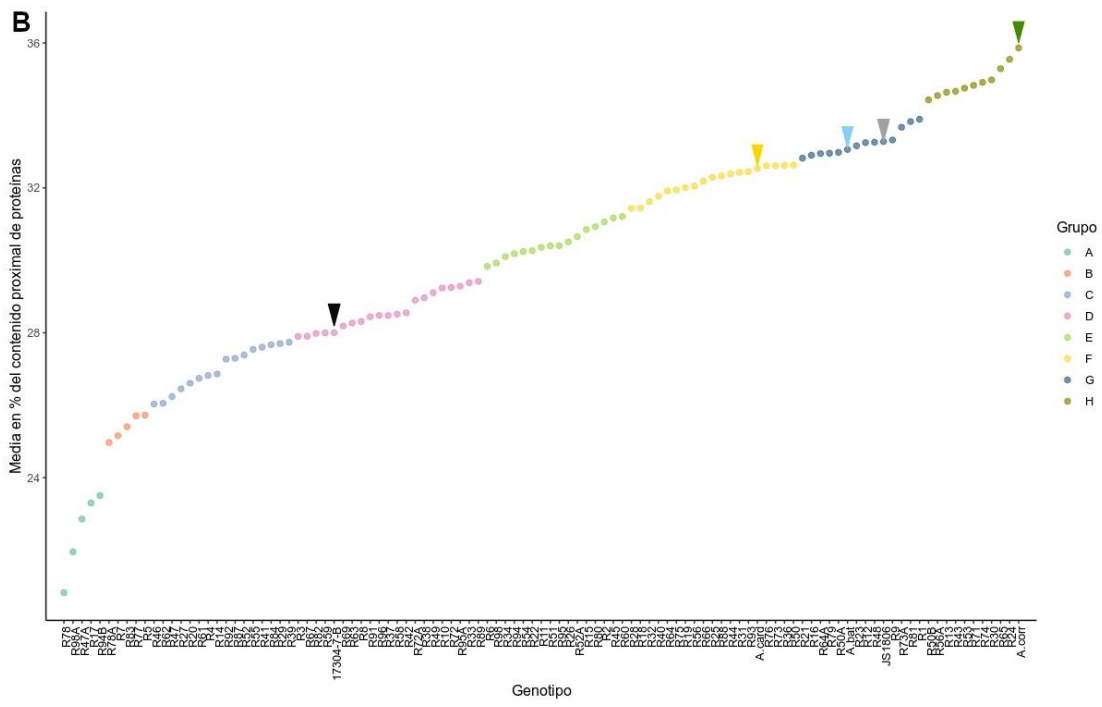
El rango de variación del contenido de fibra fue desde 8% a 12%. El contenido de fibras manifestó diferencias estadísticamente significativas entre genotipos formando cinco grupos (A, B, C, D y E) (Figura 4.4 D). Los genotipos del grupo E mostraron los valores

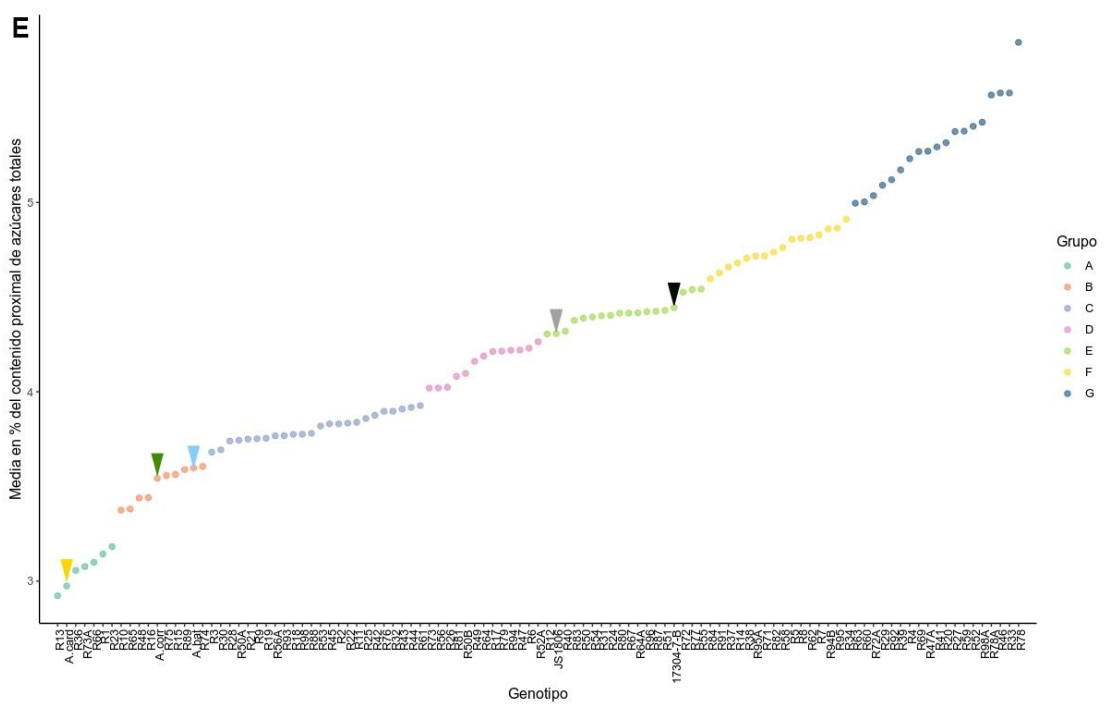
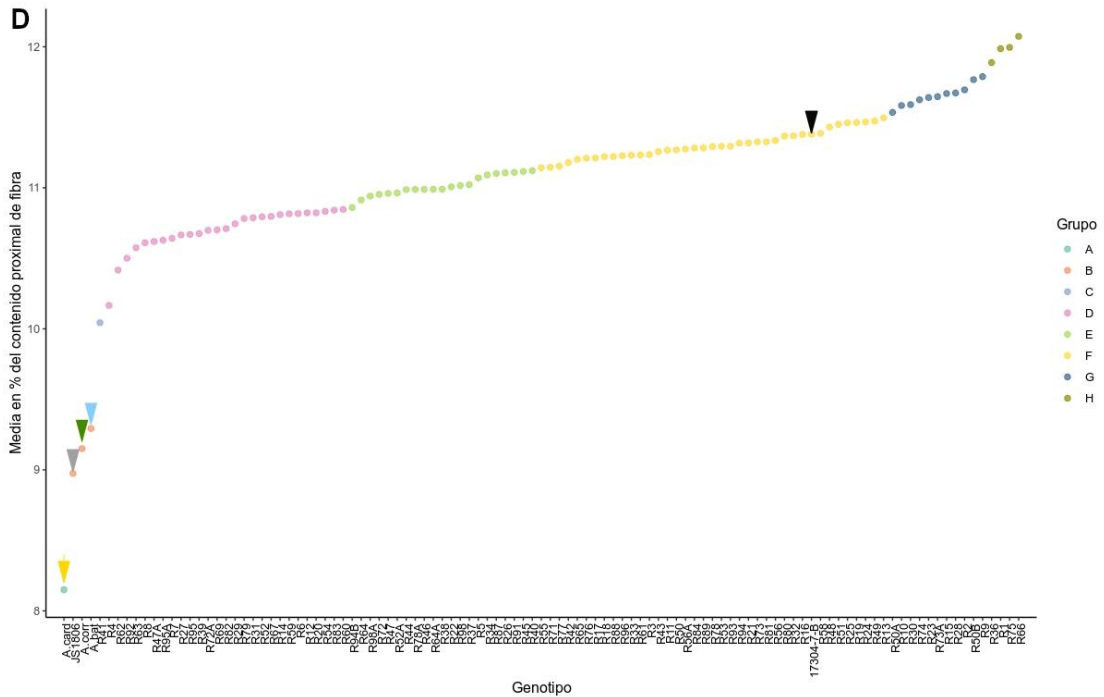
máximos de fibra con una media de 12%. El grupo A representado solo por la especie silvestre *A. cardenasii* mostró el valor mínimo de contenido de fibra con una media de 8%. El anfidiplóide, *A. correntina* y *A. batizocoi* se ubicaron en el grupo B con una media de 9%. (Figura 4.4 D).

### Azúcares totales

El rango de variación del contenido de azúcares totales fue desde 3% a 6%. El contenido de azúcares totales expresó diferencias estadísticamente significativas entre genotipos formando siete grupos (A, B, C, D, E, F y G) (Figura 4.4 E). Los genotipos del grupo G mostraron los valores máximos de azúcares con una media de 5%. Los genotipos del grupo A, al que pertenece *A. cardenasii*, presentaron los valores mínimos de contenido de azúcares con una media = 3,06%. Las especies silvestres *A. correntina* y *A. batizocoi* se ubicaron en el grupo B con una media de 4%. Los progenitores tetraploides se ubicaron en el grupo E con una media de 4% (Figura 4.4 E).





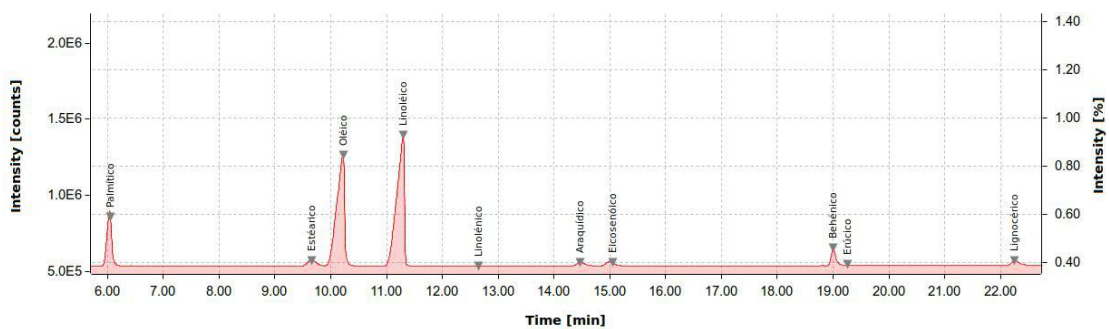


**Fig. 4.4** Comparación de medias por el método de Scott and Knott de los parámetros químicos proximales de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiploide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiploide **A**: Grasas. **B**: Proteínas. **C**: Cenizas. **D**: Fibras. **E**: Azúcares totales. Los grupos en cada gráfico indican medias sin diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ). Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la

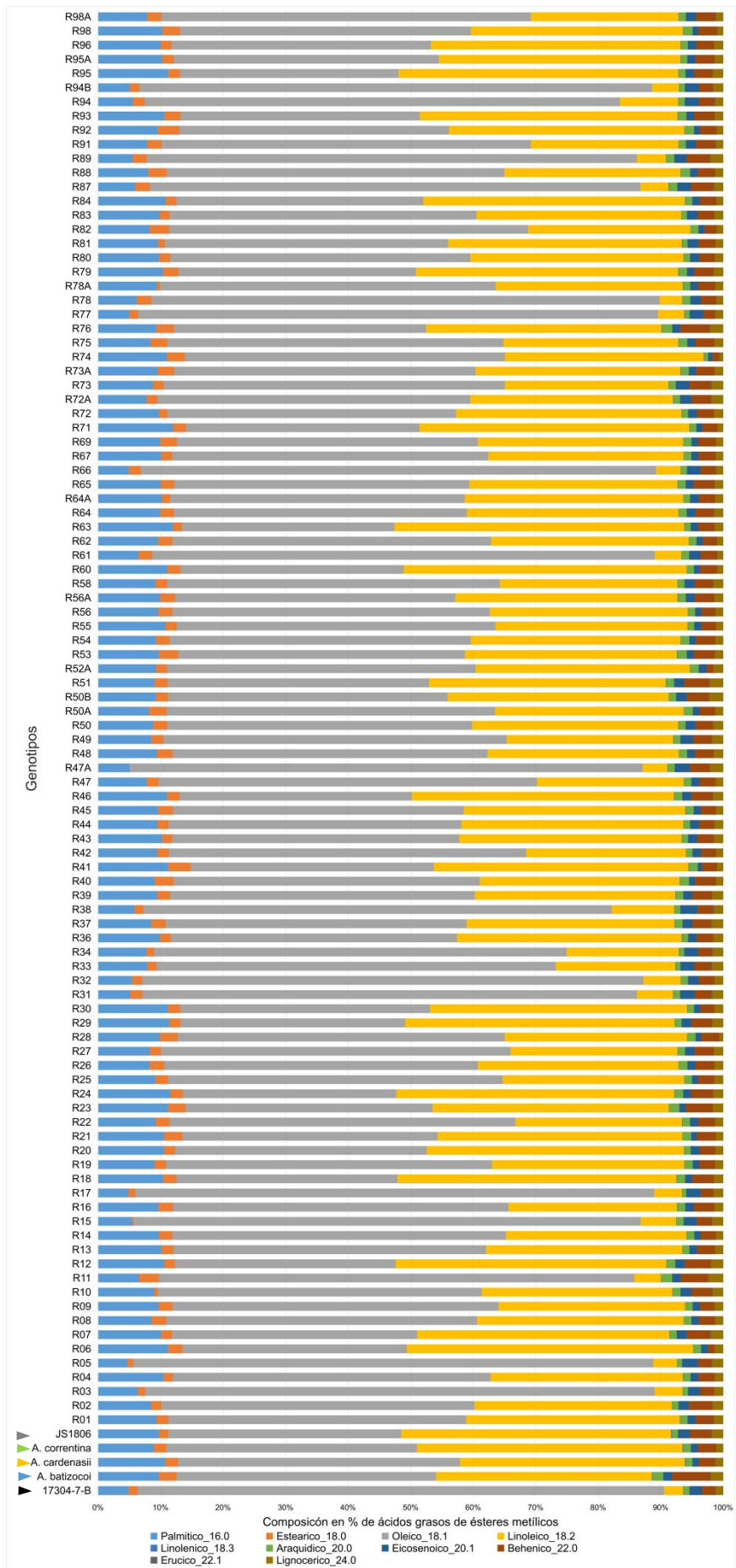
población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.

## Composición de ácidos grasos

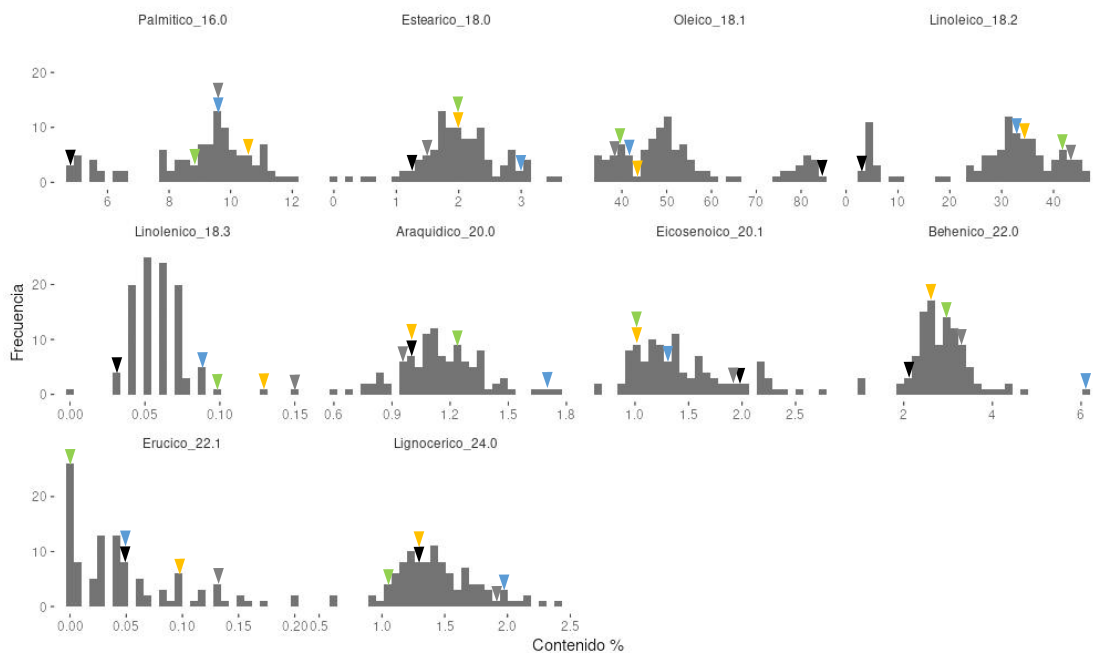
El análisis de los cromatogramas obtenidos permitió detectar los ácidos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoléico (18:2), linolénico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1), behénico (22:0), erúcico (22:1), lignocérico (24:0). La figura 4.5 muestra un cromatograma de CG representativo de los ácidos grasos de ésteres metílicos. La composición de ácidos grasos se presenta en la figura 4.6 y Anexo 4.2. La distribución de los valores de composición de ácidos grasos se ajustó, en general, a una distribución normal (Figura 4.7). La excepción fue el ácido erúcico (22:1) que presentó valores cercanos al 0.01 en 34 de los 108 genotipos analizados. Los ácidos oleico y linoléico fueron los componentes predominantes para los aceites medidos. El ácido behénico (22:0) mostró un valor alto sólo en *A. batizocoi* (6,17). La composición de ácidos grasos entre los progenitores de la población interespecífica de RILs fue contrastante para los ácidos grasos palmítico (16:0), oleico (18:1) y linoléico (18:2) que representaron aproximadamente el 90% del total de ácidos grasos. Los valores de iodo (VI) se presentan en el Anexo 4.1.



**Fig. 4.5** Cromatograma de CG representativo de los ácidos grasos de ésteres metílicos detectados a partir del extracto de aceite de semillas sanas de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. El eje *y* presenta la intensidad de la señal del detector para determinado compuesto. El eje *x* presenta el tiempo de retención de cada compuesto.



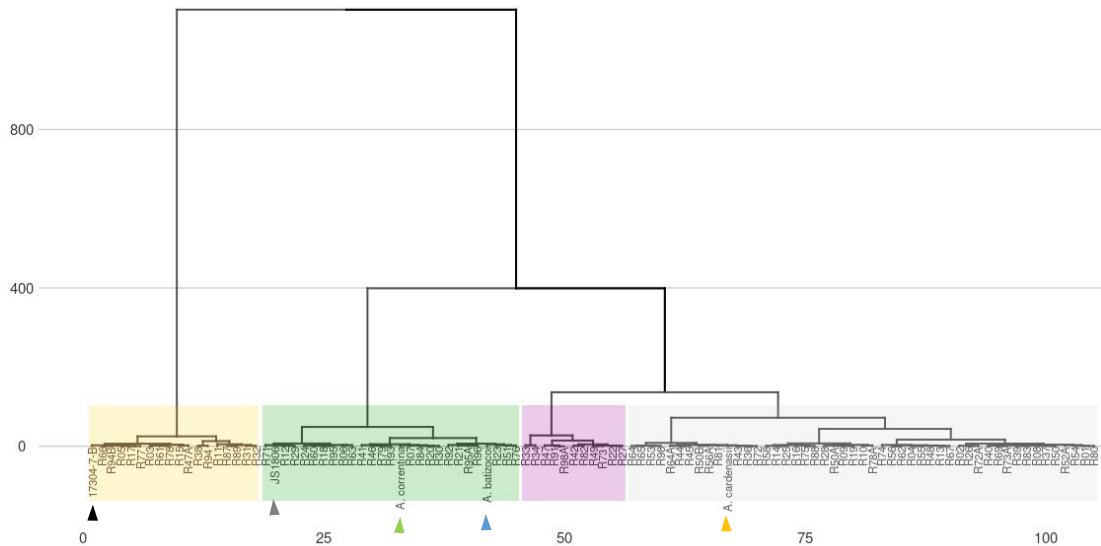
**Fig. 4.6** Composición de ácidos grasos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.



**Fig. 4.7** Histogramas de la distribución de los valores de composición de ácidos grasos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.

El análisis de conglomerados realizado con la matriz de distancias euclídeas de los datos de composición de ácidos grasos reveló la existencia de cuatro grupos fenotípicos (Figura 4.8). Uno de los grupos formado por las RILs (17) con contenidos de ácidos grasos similares al progenitor cultivado; dos grupos intermedios, uno conformado exclusivamente por RILs y otro que incluye algunas RILs y a *A. cardenasii*; y un cuarto grupo que incluyó

a las RILs con perfiles de ácidos grasos similares a las especies silvestres diploides *A. correntina* y *A. batizocoi* y el anfidiplóide.

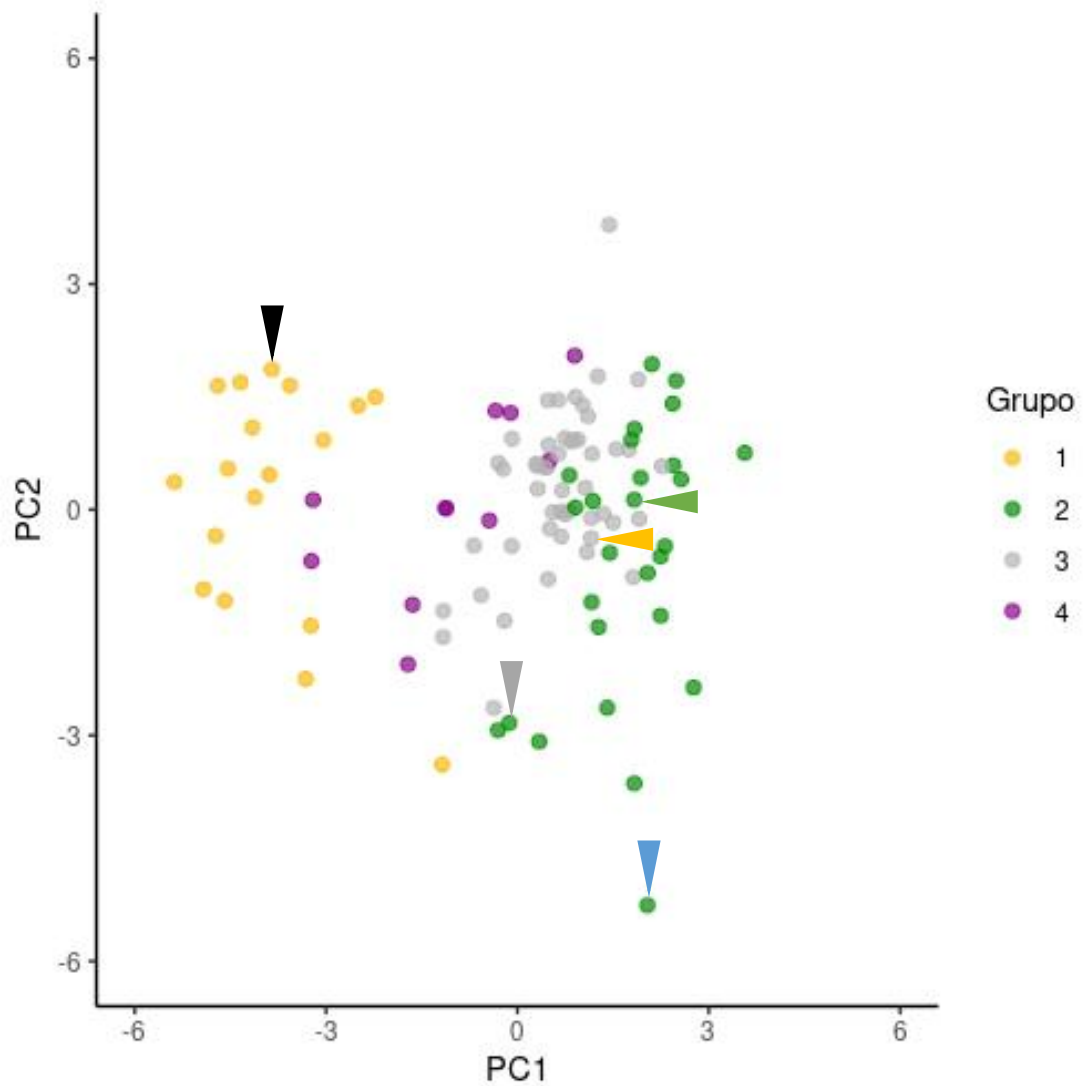


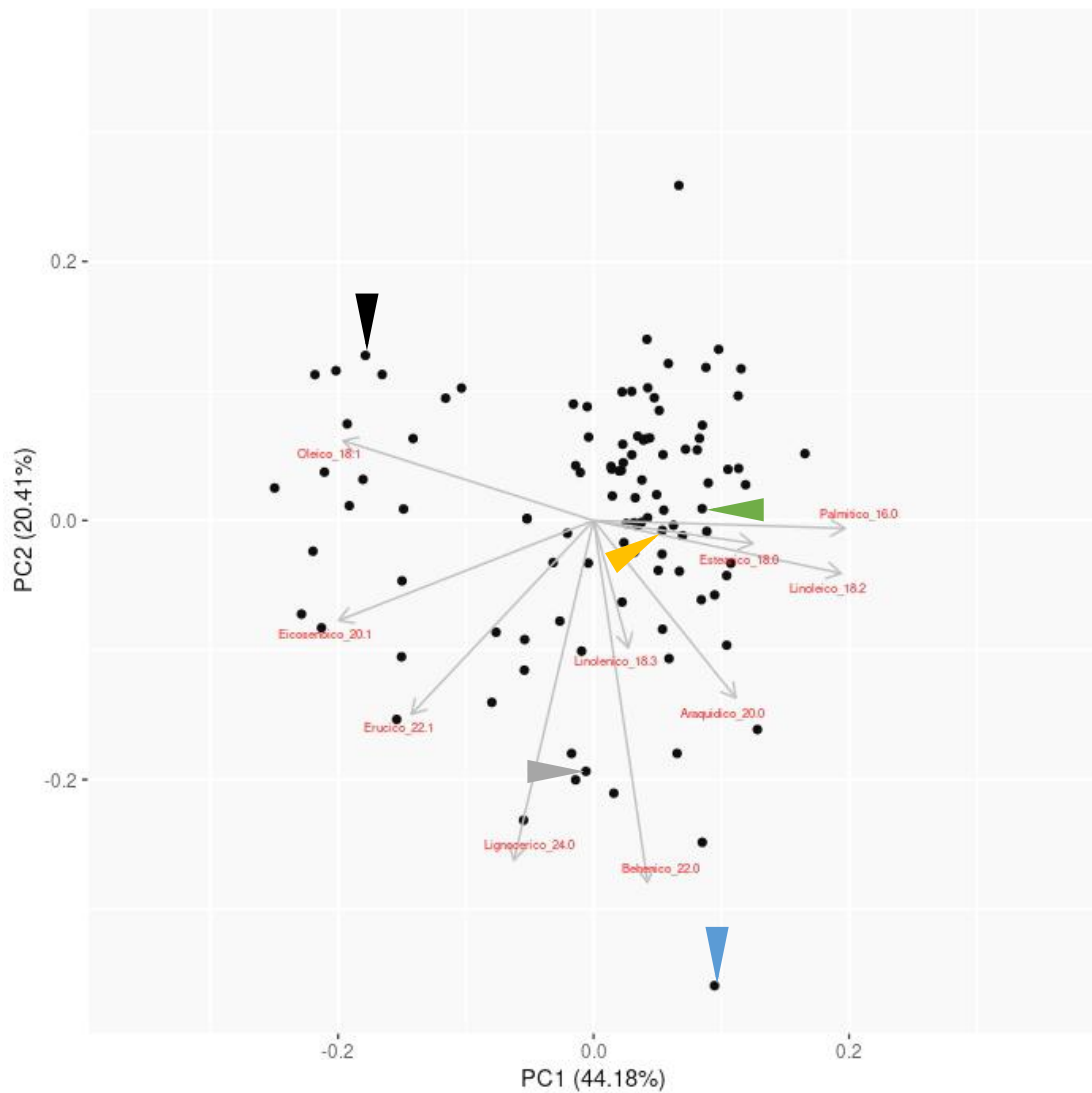
**Fig. 4.8** Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados jerárquicos a partir de una matriz de distancias euclídeas de la composición de ácidos grasos entre los genotipos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. En el eje y se indica la distancia fenética entre los genotipos evaluados. Los colores indican el grupo de genotipos formado por el análisis de conglomerados. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.

El ACP mostró que los cinco primeros componentes principales obtenidos explican en conjunto el 94% de la variabilidad de los datos para los diez ácidos grasos detectados y medidos en los 103 genotipos de maní. En el gráfico de ACP pueden visualizarse que los grupos definidos por análisis de conglomerados jerárquicos son consistentes con el agrupamiento de las nubes de puntos en su proyección sobre las CP1 y CP2 que explican el 65% de la variabilidad entre los genotipos analizados (Figura 4.9). En la Figura 4.8 B se observa la influencia de cada uno de los ácidos grasos en la definición de los componentes principales. Los ácidos, palmítico (16:0), oleico (18:1), linoléico (18:2), eicosenoico (20:1),



erúxico (22:1) fueron las variables más significativas en la separación de los genotipos con los autovectores de mayor magnitud sobre el CP1, mientras que los ácidos grasos behénico (22:0) y lignocérico (24:0) presentaron, los autovectores de mayor magnitud sobre el CP2. El ACP permitió reducir el número de variables significativas en la diferenciación de los genotipos de diez a siete.





**Fig. 4.9** Gráficos de los componentes principales de composición de ácidos grasos medidos en de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores (*A. hypogaea* y el anfidiplóide) y las especies silvestres que le dieron origen al anfidiplóide. **A:** Coloración por grupos según el análisis de conglomerados a partir de distancias euclídeas entre los genotipos y método de Ward. **B:** Visualización de los autovectores de las variables morfológicas medidas. Las flechas en distintos colores indican las especies silvestres y los progenitores de la población interespecífica de RILs: verde = *A. correntina*, amarillo = *A. cardenasii*, celeste = *A. batizocoi*, negro = progenitor *A. hypogaea* y gris = progenitor anfidiplóide.

## Valores de Iodo

Como indicador del nivel de insaturaciones presentes en los ácidos oleico, linoléico y eicosenóico, se obtuvieron los valores de iodo (VI) con una variación entre 73,88 (RIL 11) y 111,10 (RIL 06). La media de V.I. para el conjunto de genotipos analizados fue de 97,09.

### **Caracterización genotípica de los materiales para los genes *AhFAD2* por AS-PCR**

Mediante el análisis de los resultados de las PCR de la población interespecífica de RILs, sus progenitores, especies silvestres y especies de control se obtuvo una matriz de datos con los fragmentos amplificados para cada combinación de cebadores y genotipo. El resultado de las amplificaciones recodificadas y la determinación de los genotipos posibles se presentan en el Anexo 4.3. Los controles correspondientes a las especies silvestres, *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, amplificaron fragmentos que confirmaron la presencia de los genotipos diploides homocigotas wild type:  $Ol_1Ol_1$  ó  $Ol_2Ol_2$ , respectivamente. Asimismo, el patrón de amplificación en el cv. Granoleico (AO) confirmó el genotipo mutante doble recesivo  $ol_1ol_1/ol_2ol_2$ , correspondiente al fenotipo alto oleico.

Para realizar el análisis de ajuste por  $\chi^2$  a una segregación fenotípica bimodal de 15 RILs normales: 1 RIL AO (Moore y Knauff, 1989), se excluyeron 17 RILs debido a que presentaron genotipos no doble homocigotas recesivos pero sus fenotipos fueron AO (contenido de oleico > 70%). Para evaluar si esta incongruencia se debía al grado diferencial de la madurez se realizó un análisis de proporciones en el que se observó que la diferencia entre las RILs inmaduras (< 4) y maduras (> 4) (en la escala: 1 = frutos inmaduros a 5 = frutos maduros) con genotipo recodificado no doble homocigotas recesivos y fenotipo AO fue estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ), sugiriendo que gran parte de la dispersión para esos genotipos podría explicarse por el grado de madurez de los granos. El test de bondad de ajuste realizado con las consideraciones mencionadas permitió aceptar la  $H_0$  para las frecuencias de segregación 15:1 (Tabla 4.3) para los fenotipos no alto oleico: AO.

**Tabla 4.3** Análisis del ajuste la segregación fenotípica para la composición de ácidos grasos de acuerdo a un modelo digénico con dos alelos cada uno con dominancia completa en vías de expresión independientes (Moore y Knauff 1989) que determinan la proporción

oleico/linoléico en los granos de la población interespecífica de RILs derivadas del cruzamiento entre la línea anfidiplóide de fenotipo normal (JS1806) y la línea *A. hypogaea* alto oleico (JS173047-B)

Cruzamiento	Individuos normales	Individuos AO	Segregación esperada $\chi^2$	p-valor
JS1810 × JS173047-B	87	2	15:1	0.1188

El test de bondad de ajuste de la segregación genotípica esperada (1:14:1) para los genotipos doble homocigota WT (dhwt), doble mutante no doble homocigotas (dmndh), simple mutante homocigota o heterocigota (smsushm/ht y sminshm/ht) y doble homocigota mutante (dhmut), respectivamente ( $\alpha = 0.05$ ) correspondiente a dos loci con dos alelos cada uno con dominancia completa (Moore y Knauff 1989) permitió aceptar la  $H_0$  planteada (ver Tabla 4.4).

Para estimar las medias de los porcentajes de ácido oleico (18:1) y linoléico (18:2) se excluyeron las 17 RILs con genotipos no doble homocigotas recesivos que mostraron fenotipo AO (contenido de oleico > 70%) ya que el genotipo detectado no se corresponde con el fenotipo esperado y como se mencionó, tales valores podrían estar relacionados con el grado de madurez de las semillas. El progenitor cultivado y las RILs 15 y 66 resultaron con el genotipo  $ol_1ol_1/ol_2ol_2$  con un promedio de 82% de ácido oleico y 5% de ácido linoléico, mientras que el progenitor anfidiplóide y las RILs 12, 69A y 76 con genotipo  $Ol_1Ol_1/Ol_2Ol_2$  (dhwt) mostraron un promedio de 39% de ácido oleico y 40% de ácido linoléico. Un grupo de 37 RILs con genotipo  $Ol_1ol_1/Ol_2ol_2$ ,  $ol_1ol_1/Ol_2Ol_2$  (sus) mostraron un promedio de 49% de oleico y 33% de linoléico. Las 33 RILs con genotipos  $Ol_1Ol_1/Ol_2ol_2$ ,  $Ol_1Ol_1/ol_2ol_2$  (ins) resultaron con un promedio de 48,55% de ácido oleico y 32,55% de ácido linoléico. Finalmente 18 RILs con genotipo  $Ol_1ol_1/ol_2ol_2$ ,  $Ol_1ol_1/Ol_2ol_2$ ,  $ol_1ol_1/Ol_2ol_2$ ,  $Ol_1Ol_1/Ol_2ol_2$  (dmndh) resultaron con un promedio de 50% de ácido oleico y 32% de ácido linoléico.

**Tabla 4.4** Análisis del ajuste la segregación genotípica para la composición de ácidos grasos de acuerdo al modelo digénico con dos alelos cada uno con dominancia completa en vías de expresión independiente (Moore & Knauff, 1989) que determinan la proporción oleico/linoléico en los granos de la población interespecífica de RILs derivadas del

cruzamiento entre la línea anfidiplóide de fenotipo normal JS1806 y la línea *A. hypogaea* alto oleico (AO) JS173047-B

Cruzamiento	Individuos doble WT homocigotas	Individuos doble mutantes homocigotas	Individuos con cualquier otro genotipo	Segregación esperada $\chi^2$	p-valor
JS1810 × JS173047-B	3	2	99	1:14:1	0.05775

## DISCUSIÓN

### Determinación del contenido de grasas, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales

El método de agrupamiento (Scott y Knott, 1974) generó entre siete y ocho grupos de RILs para las variables proximales (grasas totales, proteínas, fibras y azúcares totales). La única variable que presentó sólo cuatro grupos fue cenizas. Comparado con trabajos previos, los grupos de genotipos aquí observados para la población de RILs fue mayor a los grupos citados para maní cultivado (Ahmed y Young, 1982); en razas autóctonas peruanas y uruguayas (Grosso *et al.*, 1995; Grosso *et al.*, 1999) y en especies silvestres de *Arachis* (Grosso *et al.*, 2000). En todos estos trabajos se citaron en promedio 3 grupos para las variables proximales medidas (grasas totales, cenizas, proteínas y azúcares totales). Esto sugiere que el uso de un anfidiplóide sintético desarrollado a partir de tres especies para introducir genes a una variedad comercial, como el progenitor *A. hypogaea* de las RILs, puede contribuir de forma significativa a ampliar la variabilidad genética disponible para caracteres nutricionales del grano de maní para ser utilizada en planes de mejoramiento.

### Contenido de grasas totales

El rango de variación en los valores de grasas (46% a 57%) observado en conjunto para todos los genotipos fue similar a lo citado por otros autores (Stalker *et al.*, 1989; Grosso *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012) en especies silvestres y cultivadas del género *Arachis*, aún con condiciones ambientales y en especies diferentes a las analizadas en este

estudio. Las RILs 62, 47A y 83 (grupo G) presentaron un contenido promedio de grasas totales de 56%, con diferencias significativas con el grupo al que pertenece el progenitor cultivado, que mostró una media de 54%. Una de las causas a las que puede atribuirse el comportamiento transgresivo de las líneas del grupo G es la acción de los loci con efecto aditivo complementario; que pudieron estar presentes en los progenitores cultivado y anfidiplóide con algún grado de heterocigosis (Rieseberg *et al.*, 1999).

El proceso de mejora del carácter contenido de grasas totales es uno de los objetivos prioritarios en el mejoramiento de cultivares de maní (Holbrook *et al.*, 2014), ya que, como se dijo anteriormente, este cultivo es una de las fuentes primarias de aceite vegetal a nivel mundial (Settaluri *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 1991). Por ello, la segregación transgresiva de RILs con mayor contenido de grasas totales que el progenitor cultivado, sugiere que aún es posible un aumento significativo de la cantidad de aceite en el grano de maní mediante el uso de progenitores genéticamente distantes.

Se ha mencionado que los caracteres de resistencia introgressados desde especies silvestres conllevan a la aparición de caracteres indeseados, en sentido agronómico, en los cultivares comerciales del maní (Holbrook y Stalker 2003). Sin embargo, todos los grupos A, B, C, D y E, con diferencias significativas a los grupos con medias de mayor contenido de grasa (F y G); mostraron rangos en los valores de grasa entre 46% y 53% que se asemejan a los publicados para el cultivar más ampliamente difundido en Argentina que es el Granoleico (50,93%) (Lozano *et al.*, 2019). Además, se encontraron 16 RILs (R4, R7, R10, R29, R41, R42, R49, R58, R60, R61, R67, R75, R78A, R92, R95A, R98A) con un valor medio de contenido de grasa total de 53% y que presentan resistencia al carbón del maní. Estos resultados sugieren que las especies silvestres utilizadas en el cruzamiento para obtener el anfidiplóide aportaron alelos de resistencia al carbón del maní y también variantes alélicas con acción aditiva y complementaria de los genes que codifican el carácter cuantitativo de grasas totales. Los materiales con estas características son los candidatos a incorporarse inmediatamente a programas de mejoramiento para el carácter mencionado.

## Contenido de proteínas

Las proteínas presentes en la semilla corresponden, en gran proporción, a proteínas de reserva, que se movilizan rápidamente durante la germinación (Krishnan *et al.*, 2001). Los valores de proteínas promedio (30%) mostraron valores similares a los citados en trabajos anteriores determinados con NIRs (28,43%) (Cheng *et al.*, 2018) y por el método de referencia de Kjeldhal (29%) (Grosso *et al.*, 2000). Sin embargo, el análisis del rango de variación mostró que los genotipos presentan hasta un 15% de variación en el contenido de proteínas. Las tres especies silvestres analizadas y el anfidiplóide integraron los grupos (F, G y H) con los valores medios más altos de proteínas (32%, 33% y 35%, respectivamente). Los valores de contenido total de proteínas observados en esta tesis para *A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi* es similar al citado por Bianchi-Hall *et al.*, (1993) para las proteínas de reserva de las mismas especies.

Si bien el contenido de proteínas no es un carácter de mejora en los programas de mejoramiento actuales en Argentina, la demanda de alimentos de alto contenido proteico podría ser atendida utilizando las líneas tetraploides identificadas en este estudio con alto contenido de proteínas totales. Existen experiencias en Guatemala (Nybo *et al.*, 2009) y en África (Guimon y Guimon, 2012) sobre la utilización de productos derivados del maní como alimento alto en proteínas no perecederas para combatir la malnutrición. Diversos alimentos terapéuticos listos para consumir (RUTF, por sus siglas en inglés) en base a maní han sido formulados para mitigar la desnutrición severa en los lugares mencionados (Arya *et al.*, 2016; Davis *et al.*, 2014). Estos alimentos son mezclas de base lipídica que contiene maní tostado molido a los que se les agrega leche en polvo, vitaminas, minerales y azúcar (Davis *et al.*, 2014). En los países de África donde se llevaron adelante tratamientos de niños desnutridos con RUTF en base a maní mostraron una tasa de recuperación superior y en menor tiempo en comparación a los resultados registrados por los protocolos de tratamiento de la desnutrición de la OMS (Patel *et al.*, 2005).

El agregado de leche en polvo en los RUTF se realiza para aumentar el contenido proteico de la mezcla ya que las mismas son proteínas completas. Se ha mencionado que las proteínas de maní también son proteínas completas y el remplazo de las proteínas de la leche por las de este cultivo, tendría importantes implicancias en la reducción del costo y accesibilidad. Por ello, las 10 RILs que agruparon en el grupo H son líneas que podrían utilizarse en un programa de mejoramiento de cultivares de maní destinados a la

elaboración de alimentos RUTF por su elevado contenido proteico. Los altos valores de proteínas totales registrados en las líneas tetraploides del grupo H coincidentes con los valores altos de las especies silvestres, evidencian que el carácter fue introgresado en estas RILS desde las especies silvestres progenitoras del anfidiplóide.

### **Contenido de cenizas**

Este es el carácter que presentó menos grupos con diferencias significativas, pero en términos relativos presentó una variación casi del 75%. Si bien el valor promedio de cenizas fue similar a los obtenidos por Grosso *et al.*, (2000) (~2,5%), en este estudio se obtuvieron cuatro grupos con medias estadísticamente significativas y rangos entre 2% y 3,23%. La ubicación de todas las especies silvestres en los dos grupos con más cenizas (C y D) indican un mayor contenido de minerales como calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio y zinc (Arya *et al.*, 2016). Las RILs pertenecientes a los mismos grupos que las especies diploides silvestres habrían introgresado el carácter de las mismas. En términos nutricionales estas líneas presentarían ventajas al ser usadas en planes de mejoramiento incorporando mayores valores de minerales que son sustratos y cofactores de metabolismos esenciales para la salud humana como lo expresan Arya *et al.*, (2016) y Settaluri *et al.*, (2012). Al igual que lo mencionado anteriormente para proteínas, los mayores contenidos de minerales de las RILs sin diferencias significativas con las especies silvestres constituyen un material interesante para la mejora de cultivares con destino a la elaboración de alimentos con elevados valores nutricionales para luchar contra la desnutrición local y mundial.

### **Contenido de fibras**

La fibra medida en este estudio corresponde a la fibra dietaria total (FDT), que mostró un rango de variación entre 8% a 12% medido con NIRS. En los pocos trabajos en los que se analizan los contenidos de fibra dietaria total de la semilla de maní cultivado utilizando métodos estándares de la AOAC se obtuvieron rangos de variación menores, entre 9% a 12% (Jonjala *et al.*, 2005) y 10% a 12% (Lintas y Cappelloni, 1992), sin diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares de *A. hypogaea* (SunOleic, Tamrun 96, Tamrun OL 01, Tamrun OL 02, TX977164 y TX 97723) analizados. Las diferencias



estadísticamente significativas en el contenido de fibras de las RILs aquí observado demuestran que existen genotipos disponibles en esta población para ser utilizados en el desarrollo de variedades comerciales con diferentes contenidos de fibra. La ubicación de las especies silvestres y del anfiploide en la cola opuesta de la distribución a la que se encuentra el maní cultivado sustenta esta hipótesis. En este sentido, el material genético de las especies silvestres permitió ampliar el rango de variación, generando genotipos en los cuales los valores de FDT son significativamente menores que el observado en la línea *A. hypogaea* (17304-7-B).

### **Contenido de azúcares totales**

El contenido de azúcar en el maní, como en otros cultivos oleaginosos, posee una dinámica negativa en función del avance de la madurez del grano (Pickett 1950). En este estudio, la evaluación de los genotipos reveló un contenido de azúcar muy variable con un rango entre 3% y 6% lo que representa una variación del 50%, con muchas RILs con valores por encima de cualquiera de los progenitores. La variación del contenido de azúcar podría atribuirse, en gran parte, a la variación en el estado de madurez de los granos analizados, ya que como se ha mencionado los genotipos son variables en la longitud de sus ciclos fenológicos. La RIL 78 que mostró el valor máximo de azúcares totales (6%) presentó un alto grado de inmadurez al momento de la cosecha (2,5 en la escala planteada de 1 = frutos inmaduros a 5 = frutos maduros). Este hecho sustentaría, al menos en parte, que el elevado valor de azúcares totales observado en varias RILs se debería a la inmadurez de los granos. Sin embargo, hay algunas RILs con estado de madurez avanzado que presentaron contenidos de azúcares significativamente mayores que el maní cultivado. Esto es un carácter relevante ya que el contenido de azúcares es uno de los caracteres utilizados para la certificación de origen del maní cordobés. En este sentido los materiales con alto contenido de azúcares aquí identificados permitirían incrementar aún más el contenido de azúcares que caracteriza al maní de esta procedencia.

En todos los parámetros químicos analizados el rango de variación observado en las RILs demuestra que se ha producido introgresión efectiva de genes de las especies silvestres que controlan la expresión de estos caracteres en el genotipo del maní cultivado. Asimismo, el rango de variación demuestra que estos genes han segregado ampliamente en la conformación de la F<sub>2</sub> a partir de la cual se derivaron las RILs. Los casos en los que las

RILs mostraron fenotipos más extremos que cualquiera de los progenitores sugieren la ocurrencia de segregación transgresiva. Rieseberg *et al.*, (1999) explica que la segregación transgresiva, como se discutió para las grasas totales, puede explicarse por la acción complementaria de alelos con efecto aditivo que se encuentran en loci diferentes entre las líneas parentales y que es una explicación ampliamente aceptada para la aparición de fenotipos extremos en familias de híbridos segregantes. Aun así, es necesario profundizar la investigación para comprender el fenómeno más claramente en relación a la determinación genética de estos caracteres en las RILs estudiadas en esta tesis.

### **Composición de ácidos grasos**

De los diez ésteres metílicos de ácidos grasos medidos (EMAG), siete resultaron con variación significativa en la población RILs y en especies silvestres analizadas. Estos fueron los ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1), linoléico (18:2), linolénico (18:3), eicosenoico (20:1), erúcico (22:1) y lignocérico (24:0) que permitieron separar la población en grupos por similitud multivariada. Sin embargo, las mayores variaciones se observaron para los ácidos oleico y linoléico, en concordancia con lo encontrado en otras especies de *Arachis* (Stalker *et al.*, 1989). Entre las especies silvestres analizadas, los valores aquí observados de ácido oleico (18:1) para *A. batizocoi*, *A. cardenasii*, y *A. correntina* (41,49; 45,09 y 40,07%, respectivamente) fueron similares a los citados por Jiang *et al.*, (2009), para las mismas especies (42; 48 y 44%, respectivamente). En todos los casos, el valor de este ácido observado en las especies silvestres fue muy inferior (<30%) al observado el cv. Granoleico (85 %), usado como control del carácter AO, y al progenitor cultivado de las RILs (84%).

La especie silvestre *A. batizocoi* mostró un valor elevado de ácido behénico (6%), similar al valor obtenido por Grosso *et al.*, (2000) para *A. matiensis* Krapov., WC Gregory & C Simpson (6%) de la sección *Procumbentes*. Afortunadamente, la expresión de este carácter observado en las RILs, en general, mostró valores inferiores al 3%. Valores alto de este ácido producen turbiedad en el aceite a bajas temperaturas (entre 0 y 4 °C) (Grosso *et al.*, 2000), y por lo tanto no es aceptado en la industria aceitera.

De todas las relaciones de ácidos grasos la más importante para la industria del maní es la relación existente entre los ácidos oleico/linoléico. Esto es debido a que los altos

valores de la relación O/L otorgan mayor estabilidad para el aceite de maní (Branch *et al.*, 1990). La relación O/L en la población interespecífica de RILs varió entre 0,73 (RIL 63) y 27,79 (progenitor cultivado) (Anexo 4.1). Las especies silvestres, el anfidiplóide y 26 RILs mostraron una relación media O/L = 0,92, significativamente inferior al valor promedio que presentan en conjunto los cultivares actuales de Argentina (1,25) (Casini *et al.*, 2004). El progenitor cultivado y las restantes 75 RILs mostraron valores medios de la relación O/L = 5,49, con un rango de 1,26 hasta 27,79.

De los materiales con alta relación O/L, resultaron de particular interés aquellos que también presentaron resistencia al carbón. En particular la RIL 61 presentó un nivel de ácido oleico de 80% y linoléico de 4%, lo que determina una relación O/L 18,84 y es altamente resistente a carbón. Asimismo, presentó un V.I. de 78,00, confirmando que posee un nivel elevado de ácidos grasos insaturados, similar al observado en el cv. Granoleico (V.I. = 78,44) (Valores de control obtenidos en este estudio). Estos resultados de la composición de EMAG y V.I. revelan que esta RIL constituye un material de premejoramiento con caracteres industriales y agronómicos muy importantes y, que a su vez, es altamente compatible con *A. hypogaea*. Por lo tanto, es un buen ejemplo de los materiales que podrían incorporarse de inmediato a los planes de cruzamientos con líneas élite AO y susceptibles al carbón del maní para obtener variedades comerciales con alta calidad química y resistentes a la enfermedad en un periodo de tiempo.

### **Caracterización genotípica de los materiales para los genes *AhFAD2* por AS-PCR.**

Dada la importancia que actualmente tiene el carácter AO para mantener la condición exportadora de Argentina, es necesario establecer los modelos de segregación del carácter de los materiales a usar en los programas de mejoramiento, así como conocer la constitución genómica de los mismos.

El análisis de la segregación fenotípica del carácter AO vs. normal se ajustó al modelo 15:1 planteada por Moore y Knauff, (1989). Estos autores reportaron la segregación 15 individuos normales: 1 individuo AO para una población F<sub>2</sub> derivada del cruzamiento entre dos líneas contrastantes de maní para el carácter AO. En base a estos resultados se propuso el modelo genético de dos genes dialélicos mayores *AhFAD2A* y *AhFAD2B*, uno en cada

genoma del maní. Tal modelo determinó que si por un lado ambos loci eran homocigotos recesivos, el contenido de ácido oleico será  $>70\%$  y el contenido de linoléico  $<5\%$ . Por otro lado, se propuso que, si al menos uno de los genes está en heterocigocis con un alelo dominante, el contenido de ácido oleico será  $<70\%$  y el ácido linoleico  $>10\%$ , y se los considera como no AO. De acuerdo a estos resultados las proporciones fenotípicas de los genes homeólogos que codifican las enzimas ácido grasos deshidrogenasa *FAD2* se ajusta a un modelo de dos loci dialélicos con dominancia completa y con interacción epistática doble dominante y expresados de forma independiente.

Los resultados genotípicos obtenidos en esta tesis se ajustan al modelo propuesto con una  $H_0$  = frecuencia de segregación 1:14:1. Tal ajuste solo se produjo cuando se re-evaluaron a posteriori los datos de contenido de ácido oleico en función del estado de madurez que presentaron las semillas de las RILs. Esto se fundamenta en el hecho de que mientras el ácido oleico es acumulado durante el crecimiento de la semilla, sólo es convertido a ácido linoleico durante la maduración de la misma cuando la expresión del gen *AhFAD2* se potencia (Chen *et al.*, 2019). Por lo tanto, el fenotipo AO puede ser erróneamente asignado si las semillas son inmaduras. Por razones climáticas (i.e. heladas tempranas) o germinación precoz, la cosecha de las semillas de las RILs usadas en esta tesis se realizó a finales de Marzo o principios de Abril, aun cuando algunas de las líneas no habían alcanzado el fin de ciclo, y por ende, algunas líneas no presentan maduración total de los granos. El análisis de proporciones realizado para evaluar la influencia de la madurez sobre la asignación del carácter AO sustentó que la dispersión observada en la expresión del carácter fenotípico AO en las RILs, con al menos un alelo WT (es decir, no doble homocigotas recesivos) podría explicarse, en parte, por el estado de inmadurez de las semillas (ver Figura 4.1). Habiendo excluido los materiales con fenotipo no concordante al genotipo, el patrón de segregación genotípica se ajustó a lo esperado para la segregación de los genes considerados.

Alternativamente, la incongruencia entre el genotipo y la condición alto oleico podría atribuirse a la presencia de otras mutaciones en las especies silvestres como las citadas anteriormente (M2-225 y Mycogen-Flavo) (Ashri, 1988), que también modifican el fenotipo AO. Asimismo, la presencia de otros genes modificadores de la expresión podría estar interviniendo en la expresión del carácter. Sin embargo, para determinar si existen fuentes genéticas adicionales que contribuyen a la variación observada en los genotipos no

doble homocigotas recesivos, es necesario plantear un diseño experimental en una región geográfica que permita cosechar todas las semillas al estado de madurez completa y ampliar la caracterización genotípica de las RILs.

## **CONCLUSIÓN**

La variabilidad encontrada para la composición proximal muestra que la población interespecífica ha introgresado segmentos cromosómicos de las especies silvestres con los genes que codifican las enzimas participantes en las vías metabólicas complejas de la determinación de los contenidos de grasas totales, proteínas, cenizas, fibras y azúcares totales. Se identificaron genotipos con mejores características que el cultivar utilizado como control, para cada uno de los parámetros químicos analizados. Los valores de la relación de O/L y de iodo observados en algunas RILs sugieren que dentro de la población se encuentran genotipos de gran interés, siendo materiales ideales para ingresar a programas de mejoramiento de variedades comerciales con alta calidad química y con resistencia al carbón.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E.H. and Young, C.T. (1982) Composition, nutrition and flavor of peanut. In: Pattee, H.E. and Young, C.T., Eds., Peanut Science and Technology, American Peanut Research and Education Society, Inc., Yoakum, 655-687.
- Arya, S. S., Salve, A. R., and Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: a review. *Journal of food science and technology*, 53(1): 31-41.
- Ashri, A. (1988). Mutagenic studies and breeding of peanut (*Arachis hypogaea*) and sesame (*Sesame indicum*). International Atomic Energy Agency, Vienna, 1988, 509.
- Barkley, N. A., Wang, M. L., and Pittman, R. N. (2011). A real-time PCR genotyping assay to detect FAD2A SNPs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic journal of biotechnology*, 14(1): 9-10.
- Barkley, N. A., Chamberlin, K. D. C., Wang, M. L., and Pittman, R. N. (2010). Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding*, 25(3): 541-548.
- Bianchi-Hall, C. M., Keys, R. D., Stalker, H. T., and Murphy, J. P. (1993). Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (*Arachis*, *Fabaceae*) species. *Plant systematics and evolution*, 186(1-2): 1-15.
- Branch, W. D., Nakayama, T., and Chinnan, M. S. (1990). Fatty acid variation among US runner-type peanut cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(9): 591-593.
- Cámara del Mani. Cluster manisero argentino. CAM, Córdoba, Argentina. <http://www.camaradelmani.org.ar/english/exports/> (acceso el 25 de noviembre de 2020).
- Chen, C. Y., Butts, C. L., Dang, P. M., and Wang, M. L. (2015). Advances in phenotyping of functional traits. In *Phenomics in crop plants: Trends, options and limitations* (pp. 163-180). Springer, New Delhi.
- Chen, X., Lu, Q., Liu, H., Zhang, J., Hong, Y., Lan, H., ... and Pandey, M. K. (2019). Sequencing of cultivated peanut, *Arachis hypogaea*, yields insights into genome evolution and oil improvement. *Molecular plant*, 12(7): 920-934.
- Chen, Z., Wang, M. L., Barkley, N. A., and Pittman, R. N. (2010). A simple allele-specific PCR assay for detecting FAD2 alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(3): 542-548.
- Cheng, J. H., Jin, H., and Liu, Z. (2018). Developing a NIR multispectral imaging for prediction and visualization of peanut protein content using variable selection algorithms. *Infrared Physics and Technology*, 88, 92-96.
- Chu, Y., Holbrook, C. C., and Ozias-Akins, P. (2009). Two alleles of ahFAD2B control the high oleic acid trait in cultivated peanut. *Crop Science*, 49(6): 2029-2036.
- Dash, S., Cannon, E. K., Kalberer, S. R., Farmer, A. D., and Cannon, S. B. (2016). PeanutBase and other bioinformatic resources for peanut. In *Peanuts* (pp. 241-252). AOCS Press.
- Dain, A., Repossi, G., Diaz-Gerevini, G. T., Vanamala, J., Das, U. N., and Eynard, A. R. (2016). Long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) modulate metabolic and inflammatory markers in a spontaneous type 2 diabetes mellitus model (Stillman Salgado rats). *Lipids in health and disease*, 15(1): 205.

- El Bacha, T., Luz, M., and Da Poian, A. (2010). Dynamic adaptation of nutrient utilization in humans. *Nat. Educ*, 3(8).
- Food composition NAL-USDA  
[http://fnic.nal.usda.gov/nal\\_display/index.php?info\\_center=4&tax\\_level=2&tax\\_subject=279&topic\\_id=1553](http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=279&topic_id=1553).
- Greger, J. L. (1999). Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *The Journal of nutrition*, 129(7): 1434S-1435S.
- Grosso N. R. (2020) Productos Derivados de Maní. Primer encuentro internacional - El maní, un superalimento. <http://www.manisuperalimento.com.ar/index.php>
- Grosso, N. R., Nepote, V., and Guzmán, C. A. (2000). Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3): 806-809.
- Guimon J, Guimon P. (2012) How Ready-to-Use therapeutic food shapes a new technological regime to treat child malnutrition. *Technol Forecast Soc Chang* 79(7):1319–1327
- Hashim, I. B., Koehler, P. E., Eitenmiller, R. R., and Kvien, C. K. (1993). Fatty acid composition and tocopherol content of drought stressed Florunner peanuts. *Peanut Science*, 20(1): 21-24.
- Higgs, J. (2003). The beneficial role of peanuts in the diet–Part 2. *Nutrition and Food Science*.
- Hoffman, J. R., and Falvo, M. J. (2004). Protein–which is best?. *Journal of sports science and medicine*, 3(3): 118.
- Holbrook, C. C., Brenneman, T. B., Stalker, H. T., Johnson, W. C., Ozias-Akins, P., Chu, Y., and Specht, J. (2014). Peanut. In *Yield Gains in Major US Field Crops* (Vol. 33, pp. 173-194). Madison: CSSA Special Publications.
- Holbrook, C.C., and H.T. Stalker. (2003). Peanut breeding and genetic resources. p. 297–356. In J. Janick, editors, *Plant Breeding Reviews*. John Wiley and Sons, Inc.
- Hurst L. D. 1996. Further evidence consistent with *Stellate's* involvement in meiotic drive. *Genetics*. 142, 641-643.
- Jiang, H. F., Xiao-Ping, R. E. N., HUANG, J. Q., Yong, L. E. I., and Bo-Shou, L. I. A. O. (2009). Acid components in *Arachis* species and interspecies hybrids with high oleic and low palmitic acids. *Acta Agronomica Sinica*, 35(1): 25-32.
- Jonnala, R. S., Dunford, N. T., and Dashiell, K. E. (2005). New high-oleic peanut cultivars grown in the Southwestern United States. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(2): 125-128.
- Khera, P., Upadhyaya, H. D., Pandey, M. K., Roorkiwal, M., Sriswathi, M., Janila, P., and Leebens-Mack, J. (2013). Single nucleotide polymorphism–based genetic diversity in the reference set of peanut (*Arachis* spp.) by developing and applying cost-effective kompetitive allele specific polymerase chain reaction genotyping assays. *The plant genome*, 6(3): 1-11.
- Krishnan, H. B., and Coe Jr, E. B. (2001). Seed storage proteins. *Encyclopedia of Genetics*, 1782-1787.
- Lintas, C., and Cappelloni, M. (1992). Dietary fiber content of Italian fruit and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(2): 146-151.
- Lopes, R. M., Agostini-Costa, T. D. S., Gimenes, M. A., and Silveira, D. (2011). Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9): 4321-4330.

- Lozano, M. G., de Oliveira Sartori, A. G., Markowicz Bastos, D. H., and Bismara Regitano - d'Arce, M. A. (2019). Selected nutrients and antinutrients in peanut cultivars harvested in Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12): 5334-5340.
- McCouch, S. R., Zhao, K., Wright, M., Tung, C. W., Ebana, K., Thomson, M., ... and McClung, A. (2010). Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breeding Science*, 60(5): 524-535.
- Moore, K. M., and Knauft, D. A. (1989). The inheritance of high oleic acid in peanut. *Journal of Heredity*, 80(3): 252-253.
- Nassourou, M. A., Noubissié, T. J. B., Njintang, Y. N., and Bell, J. M. (2017). Diallel analyses of soluble sugar content in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *The Crop Journal*, 5(6): 553-559.
- Neelam, K., Brown-Guedira, G., and Huang, L. (2013). Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus Lr21. *Molecular breeding*, 31(1): 233-237.
- Nybo, T. (2009). Fighting chronic malnutrition among impoverished children in Guatemala. United Nations Children's Fund. At a glance: Guatemala. <http://www.unicef.org/infobycountry/guatemala.html>.
- Pattee, H. E., Isleib, T. G., Giesbrecht, F. G., and McFeeters, R. F. (2000). Relationships of sweet, bitter, and roasted peanut sensory attributes with carbohydrate components in peanuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3): 757-763.
- Pickett, T. A. (1950). Composition of developing peanut seed. *Plant physiology*, 25(2): 210.
- Rieseberg, L. H., Archer, M. A., and Wayne, R. K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83, 363–372. doi: 10.1038/sj.hdy.6886170
- Sanders, T. (2002). Groundnut oil. *Vegetable Oil in Food Technology: Composition, Properties, and Uses*. FD Gunstone (Eds). Blackwell Publishing. Oxford UK, 231-243.
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility–corrected amino acid score. *The Journal of nutrition*, 130(7): 1865S-1867S.
- Settaluri, V. S., Kandala, C. V. K., Puppala, N., and Sundaram, J. (2012). Peanuts and their nutritional aspects—a review.
- Shi, Z., Liu, S., Noe, J., Arelli, P., Meksem, K., and Li, Z. (2015). SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC genomics*, 16(1): 314.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57(3): 1102–1120.
- Stalker, H. T., Young, C. T., and Jones, T. M. (1989). A survey of the fatty acids of peanut species. *Oleagineux (France)*.
- Teixeira, M. C., Coelho, N., Olsson, M. E., Brodelius, P. E., Carvalho, I. S. D., and Brodelius, M. (2009). Molecular cloning and expression analysis of three omega-6 desaturase genes from purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Biotechnology letters*, 31(7): 1089-1101.
- Tripathy, K., Mishra, R., Mishra, D., Mohanty, K., Dash, S., Swain, D., and Mohanty, R. (2016). Inheritance pattern of oil content in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Gene and Trait*, 7.



- Tuberoso, C. I., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., and Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4): 1494-1501.
- "UniProt: the universal protein knowledgebase." *Nucleic acids research* 45, no. D1 (2017): D158-D169.
- USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24, 2011.
- Venkatachalam, M., and Sathe, S. K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(13): 4705-4714.
- Wang, M. L., Chen, C. Y., Davis, J., Guo, B., Stalker, H. T., and Pittman, R. N. (2010). Assessment of oil content and fatty acid composition variability in different peanut subspecies and botanical varieties. *Plant Genetic Resources*, 8(1): 71-73.
- Young, C. T., and Hammons, R. O. (1973). Variations in the protein levels of a wide range of peanut genotypes (*Arachis hypogaea* L.). *Oleagineux*.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., and Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual review of plant biology*, 61, 209-234.
- Zhao, S., Li, A., Li, C., Xia, H., Zhao, C., Zhang, Y., and Wang, X. (2017). Development and application of KASP marker for high throughput detection of AhFAD2 mutation in peanut. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 9-12.

## CAPITULO V

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA POBLACIÓN, CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTL PARA RESISTENCIA AL CARBÓN DEL MANÍ

## INTRODUCCIÓN

El carbón ha sido hasta el momento registrado oficialmente como una enfermedad del maní cultivado sólo en Argentina, aunque se ha documentado la presencia de esta enfermedad en accesiones de especies silvestres de Bolivia y Brasil (Carranza y Lindquist, 1962; Soave *et al.*, 2014). Un limitado grupo de cultivares comerciales no alto oleico, aunque susceptibles, exhiben cierto nivel de tolerancia al carbón del maní (“Pepe Asem INTA” y “Manigran”) con una reducción la incidencia de un ~30% (Rago *et al.*, 2017) y un cultivar alto oleico (EC-191-RC) con una reducción en la incidencia de un ~50% (Soave, com. pers.; Ré, 2019). Sin embargo, los cultivares que son sembrados preponderantemente en la región del centro del país son susceptibles al carbón del maní. Lo que, asociado a un manejo inadecuado, provocó que *T. frezii* se esparciera rápidamente a través de toda el área de cultivo intensivo de Córdoba (Cignetti *et al.*, 2010). Los efectos de la enfermedad se han tratado de mitigar utilizando diferentes fungicidas, y diversas modificaciones a las prácticas culturales (rotaciones, etc.). El uso de diferentes fungicidas y diversas modificaciones a las prácticas culturales para reducir los efectos de la enfermedad han incrementado los costos de producción (Rago *et al.*, 2017) y no han sido efectivas y de aplicación masiva.

La identificación de fuentes de resistencia al carbón en las razas locales antiguas de maní y en las especies silvestres conservadas en los bancos de germoplasma ha permitido desarrollar diversas estrategias tendientes a incorporar la resistencia a las variedades comerciales del maní. Recientemente, se publicó la introgresión de resistencia al carbón del maní en líneas cultivadas y en material de pre-mejoramiento desde razas locales de maní (Bressano *et al.*, 2019). Esta es una de las vías más rápidas de introgresión, ya que se usaron materiales tetraploides con la misma constitución genómica. A partir de

cruzamientos iniciales entre tres cultivares comerciales susceptibles al carbón del maní (*Arachis hypogaea* L. subsp. *hypogaea*) y dos razas locales (*Arachis hypogaea* L. subsp. *fastigiata* Waldron) se desarrolló una población mixta de líneas recombinantes endocriadas (RILs, por sus siglas en inglés). Entre ellas, se encontraron materiales resistentes a la enfermedad que han sido incorporadas a planes de mejoramiento para el desarrollo de cultivares comerciales con este atributo.

A pesar de este significativo avance en el desarrollo de materiales resistentes a la enfermedad, existe una preocupación creciente sobre la variabilidad genética existente en *T. frezii* y su capacidad de quebrar la resistencia encontrada en genotipos de la especie cultivada (Rago *et al.*, 2017). Por este motivo, y en paralelo, se desarrolló un plan de identificación de resistencia en especies silvestres, tal como se describió en el capítulo II, y cuyos resultados fueron presentados por Oddino *et al.*, (2017). Al no encontrarse infecciones en ninguna de las especies silvestres evaluadas, las mismas se convirtieron en excelentes candidatas para desarrollar materiales compatibles en el nivel de ploidía y constitución genómica con el maní cultivado. El desarrollo de la población de RILs descrito en el Capítulo II a partir del cruzamiento entre una línea comercial de maní (AABB) y un anfidiplóide (AAKK), sintetizado a partir de las especies silvestres (*A. correntina* × *A. cardenasii*) × *A. batizocoi*)<sup>4x</sup> permitió, no sólo la introgresión de la resistencia del carbón en la línea comercial, sino también establecer una población adecuada para el mapeo de los genes de resistencia a carbón.

El desarrollo de variedades comerciales de maní en Argentina se ha realizado, hasta el momento, por métodos tradicionales (Haro *et al.*, 2013) con un alto requerimiento de recursos humanos e inversión. Este proceso puede ser acelerado incorporando métodos de mejoramiento asistido por herramientas moleculares, como ya ha sido demostrado en la mejora de varios caracteres de interés en maní en otros lugares del mundo, incluyendo resistencias a plagas y enfermedades (Burow *et al.*, 2001; Varshney *et al.*, 2014; Pasupuleti *et al.*, 2016). Para tal fin, resulta imprescindible el desarrollo de marcadores específicos basados en el conocimiento de la arquitectura genética de los caracteres que se deseen mejorar.

La disponibilidad de material vegetal con características adecuadas, como la población de RILs, motivo de estudio de esta tesis, permite desarrollar ensayos experimentales necesarios para generar los datos fenotípicos y genómicos requeridos para

estudiar la estructura genética de los caracteres e inferir los efectos ambientales sobre los mismos (Dodia *et al.*, 2019). La reciente publicación de los genomas de referencia de maní tetraploide y de sus progenitores en bases de datos públicas (<https://peanutbase.org>) (Bertioli *et al.*, 2019; Bertioli *et al.*, 2016), (DDBJ/ENA/GenBank con el nombre de accesión SDMP01000000) (Chen *et al.* 2019), (<http://peanutgr.fafu.edu.cn>) (Zhuang *et al.*, 2019) constituye un hito en el estudio de los atributos genéticos del germoplasma de maní, incrementando el potencial del análisis de las secuencias, anotación, descubrimiento de genes candidatos y, por ende, en el desarrollo de marcadores moleculares más eficientes para utilizarlos en mejoramiento asistido.

En este sentido, para acelerar el desarrollo de variedades resistentes a carbón por mejoramiento asistido, aún se requiere del desarrollo de marcadores moleculares específicos. A partir del análisis de la segregación en la población de RILs generada utilizando razas locales de maní resistentes (Bressano *et al.*, 2019) se citaron niveles significativos de variación fenotípica y valores elevados de heredabilidad en sentido amplio para el carácter. Asimismo, se sugirió que la resistencia al carbón del maní estaría controlada por pocos *loci* mayores y algunos modificadores. Sin embargo, hasta el momento, la estructura genética de la resistencia al carbón derivada de materiales tetraploides permanece desconocida y no se han identificado QTLs para el carácter. Tampoco se conoce la estructura genética de la resistencia existente en las especies de *Arachis* silvestres ni las regiones cromosómicas que poseen los genes determinan el carácter.

Por tal motivo, en este capítulo se describe la caracterización genotípica del anfiploide (*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoi*<sup>4x</sup> por SSRs y SNPs y de la población interespecífica de RILs descrita en el capítulo II por medio de SNPs usando la plataforma 'Axiom\_*Arachis2*' 48K (Clevenger *et al.*, 2018). Con los SNPs polimórficos se construyó un mapa genético, se identificaron las regiones genómicas (QTL) que confieren la resistencia al carbón del maní en un contexto genético tetraploide y se analizaron los genes candidatos presentes en dichas regiones. De esta manera, se espera que a partir de la información generada se desarrollen marcadores de ADN de aplicabilidad en el desarrollo de variedades resistentes a carbón por mejoramiento asistido por genómica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron todos los genotipos de la población interespecífica de RILs, sus progenitores y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide según se describió en el capítulo II

### Caracterización molecular del anfidiplóide con marcadores SSR

Se realizó una evaluación inicial usando 373 marcadores microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés) que se basan en el polimorfismo de regiones repetitivas de hasta 10 pares de bases (pb) distribuidas por todo el genoma. En el panel de genotipos analizados se incluyeron a las especies silvestres *A. cardenasii* (KSSc 36015), *A. correntina* (K 11905), *A. batizocoi* (K 9484) y a los progenitores de la población interespecífica de RILs. El set de 373 marcadores moleculares estuvo compuesto por 288 SSR desarrollados en el contexto de esta tesis en una pasantía realizada en el National Peanut Lab, USDA (Arias *et al.*, 2018), así como 12 InDel (marcadores de inserciones y deleciones) y 73 SSR previamente usados en la literatura (Moretzsohn *et al.*, 2005; Proite *et al.*, 2007; Leal-Bertioli *et al.*, 2009).

El ADN genómico total se extrajo de folíolos jóvenes sin desplegar de todos los genotipos usando DNeasy® PowerPlant® Pro Kit (Qiagen) y el método CTAB (Doyle and Dickson, 1987). El ADN se cuantificó por espectrofotometría usando el equipo DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer. A los cebadores 5' - 3' se les agregó una cola con la secuencia 5' - CAGTTTTCCCAGTCACGAC - 3' (Waldbieser *et al.*, 2003) y los cebadores 3' - 5' se les agregó una cola en el extremo 5' con la secuencia 5' - GTTT - 3' para promover la adenilación sin complementariedad de bases (Brownstein *et al.*, 1996). La secuencia del cebador 5' - CAGTTTTCCCAGTCACGAC - 3' marcada con 6-carboxy-X-rhodamine (ROX, por sus siglas en inglés) (IDT-Technologies) se usó para amplificar 10 ng de ADN usando la Taq polimerasa Titanium (Clontech) según lo descrito en Arias *et al.*, (2018). Brevemente, se usaron 5 µL de volumen de reacción en un termociclador M&J *thermal cycler* (BioRad) a 95°C por 1 min, 60°C por 1 min (2

ciclos), 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 68°C por 30 s (27 ciclos) y una temperatura de extensión final a 68°C por 4 min. Los fragmentos fluorescentes producto de la PCR fueron separados y analizados por electroforesis capilar en un equipo ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) y los datos se procesaron con el software Peak Scanner™ Software 1.0 (© Copyright 2006. Applied Biosystems); mediante este software se visualizaron los electroferogramas de cada marcador para cada muestra.

### **Medición y análisis de los marcadores SSR**

Los alelos fueron identificados por la longitud (en pb) de las secuencias amplificadas. La tabla de datos genotípicos con el tamaño de los fragmentos amplificadas fue transformada a tabla de frecuencias alélicas y se generó una matriz de datos binarios que se usó en todos los análisis posteriores. Los marcadores con más del 5% de datos faltantes se descartaron. Los alelos nuevos encontrados en el anfidiplóide (alelos no identificados en ninguno de los progenitores silvestres) se conservaron como informativos y se consideraron como una consecuencia de la inestabilidad genómica asociada a la hibridación y duplicación cromosómica (Song *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005).

### **Confirmación de la condición trihíbrida del anfidiplóide**

Para confirmar la composición trihíbrida del anfidiplóide, se registraron los fragmentos especie específicos y aquellos conservados entre el anfidiplóide y las especies silvestres que le dieron origen. La contribución de los alelos de las especies silvestres al genoma del anfidiplóide se calculó como el porcentaje de alelos específicos amplificadas en cada una de las especies silvestres y los alelos comunes entre dos especies silvestres que se encontraron y registraron en el anfidiplóide. Se calcularon la diversidad genética, la heterocigosis, el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) y el número de alelos por locus.

Las distancias euclídeas entre el anfidiplóide y las especies silvestres se calcularon usando un set de datos obtenidos a partir de 235 secuencias amplificadas. Con la matriz de distancias obtenida se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos usando el método UPGMA entre las especies silvestres y el anfidiplóide. El conjunto de datos moleculares se

analizó también mediante un método de escalado multidimensional (MDS) y AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992).

### **Genotificado con marcadores SNPs**

Las muestras de ADN de todos los genotipos de las RILs, sus progenitores y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide se genotificaron con la plataforma 48K Axiom *Arachis2* SNP array (Clevenger *et al.*, 2018). Esta plataforma se basa en la tecnología de hibridación de fragmentos de ADN genómico a sondas que contienen marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés). Esta tecnología denominada en inglés *microarray* se utiliza para conocer la variante de un SNP determinado en cada una de las 384 muestras en simultáneo. La tecnología utilizada por Thermofisher® (Santa Clara, USA) para conocer el estado de cada SNP comienza por la digestión del ADN con enzimas de restricción que cortan al ADN en sitios específicos para fragmentar las cadenas largas de ADN genómico. El ADN fragmentado se coloca en pequeñas celdas del *microarray* que consiste en una pieza de vidrio o polímero de nylon. Cada una de estas celdas tiene a su vez 47.116 microceldas donde se ubican dos sondas (pequeñas secuencias de 15/20 pb), una de las cuales tiene una variante del SNP y la otra, la variante alternativa. Los fragmentos de ADN complementarios a una sonda o a las dos, al hibridar con estas, generan una señal lumínica que es leída por un sensor y se establece un valor de intensidad de la señal de cada una de las alternativas para cada uno de los 47.116 marcadores analizados.

### **Curado de datos de los marcadores SNP**

Los datos genotípicos se procesaron usando el *software* Axiom Analysis Suite 5.0.1.38 (<https://www.thermofisher.com>). El análisis de las señales crudas emitidas por cada variante de SNPs se realizó con el modelo bayesiano lineal robusto basado en distancias de Mahalanobis (BRLMM, por sus siglas en inglés) disponible en el *software* Axiom Analysis Suite. El modelo BRLMM es un modelo de agrupamiento que adapta las localizaciones pre posicionadas para cada genotipo (*priors*) a los datos de las muestras evaluadas y computa tres localizaciones posteriores de los grupos de genotipos. El modelo de agrupamiento varía en función de la ploidía del organismo analizado. En esta tesis, el análisis de las

especies silvestres se realizó utilizando el modelo para organismos diploides mientras que las RILs y sus progenitores se analizaron utilizando un modelo diseñado para organismos tetraploides. En la figura 5.1 se visualiza un gráfico que representa la identificación típica de las alternativas genotípicas que pueden presentarse en el análisis de SNP en un panel tetraploide. Los gráficos de las alternativas muestran en el eje *x* el contraste (*contrast*) entre las señales de las alternativas A y B para cada SNP, y en el eje *y* la intensidad (*size*) de la señal total. La representación gráfica de la posición del genotipo en el plano cartesiano, se construye en función de las siguientes ecuaciones 5.1, 5.2 y 5.3.

### **Ecuación 5.1**

$$\text{Señal de A} = \#A \times 100 + 100$$

$$\text{Señal de B} = \#B \times 100 + 100$$

Intensidad de las señales de las alternativas alélicas A y B. #A es el valor de fluorescencia de la sonda con el SNP A. #B es valor de fluorescencia de la sonda con el SNP B.

### **Ecuación 5.2**

$$\text{Contraste} = \log_2\left(\frac{\text{Señal de A}}{\text{Señal de B}}\right)$$

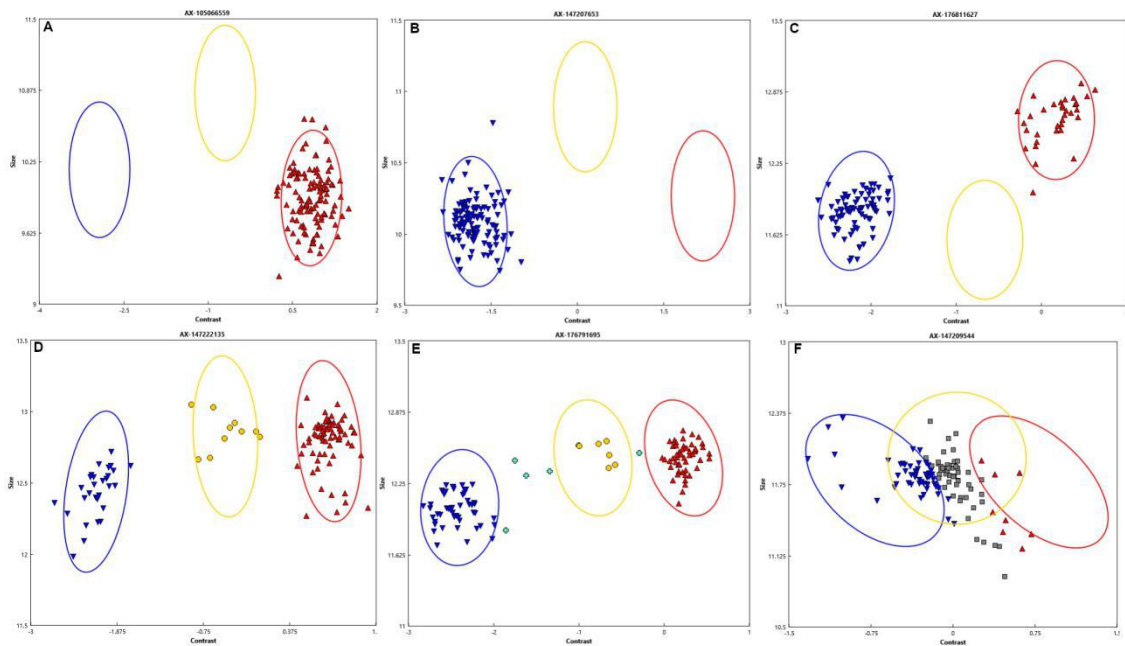
Contraste entre las señales A y B de las sondas posibles en el *microarray*.

### **Ecuación 5.3**

$$\text{Intensidad total} = \left[ \frac{\log_2(\text{Señal de A}) + \log_2(\text{Señal de B})}{2} \right]$$

Intensidad total de las señales A y B de las sondas presentes en el *microarray*.





**Fig. 5.1** Ejemplo de gráficos de las alternativas genotípicas que pueden presentarse en el análisis de SNP en un panel tetraploide. Los triángulos rojos corresponden a la alternativa de genotipos AA, los triángulos invertidos azules corresponden a la alternativa de genotipos BB, el círculo amarillo corresponde a la alternativa de genotipo AB, la cruz celeste corresponde a genotipos con dosaje alélico intermedio entre AAAA, AABB y BBBB (AAAB, ABBB), los cuadrados grises corresponden a genotipos no identificados. Los elipses indican la dispersión a *posteriori* de los genotipos al ser analizados con el modelo bayesiano correspondiente. **A** SNP monomórfico AA. **B** SNP monomórfico BB, **C** SNP polimórfico con genotipos AA y BB. **D** SNP polimórfico con genotipos AA, AB y BB. **E** SNP con variantes consistentes para genotipos con recombinación tetrasómica: AAAA, AAAB, AABB, ABBB, BBBB. **F** SNP con tasa de detección de genotipos por debajo de un valor de corte (baja calidad del SNP para determinar genotipos).

Para analizar y filtrar la salida del análisis de datos genotípicos crudos se escribió un comando UNIX (lenguaje de programación libre) (Ritchie y Thompson, 1978) (Anexo 5.1). Inicialmente, los resultados crudos del genotipificado se extrajeron como SNP *calling* (AA, BB ó AB) usando el panel de especies diploides silvestres y el anfidiplóide. Este set de marcadores se filtró para identificar marcadores SNP específicos de cada una de las tres especies silvestres progenitoras presentes en el anfidiplóide de la siguiente manera:

- marcadores específicos *A. correntina*/anfidiplóide: *A. correntina* = anfidiplóide  $\neq$  (*A. cardenasii* = *A. batizocoi*)
- marcadores específicos *A. cardenasii*/anfidiplóide: *A. cardenasii* = anfidiplóide  $\neq$  (*A. correntina* = *A. batizocoi*)
- marcadores específicos *A. batizocoi*/anfidiplóide: *A. batizocoi* = anfidiplóide  $\neq$  (*A. correntina* = *A. cardenasii*)

Seguidamente, los tres grupos de datos compuestos por los SNP informativos identificados en el primer paso se compararon con el panel constituido por los genotipos tetraploides (progenitor cultivado, anfidiplóide y la población de 103 RILs) y sólo se conservaron aquellos marcadores diferentes entre el anfidiplóide y el progenitor cultivado. También se registraron los marcadores específicos para el progenitor cultivado (*A. hypogaea*). Todos los SNPs que pasaron los pasos de filtrado fueron considerados para los análisis subsiguientes tanto si habían sido mapeados o no en la versión del genoma de *A. hypogaea* cv. Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019; Clevenger *et al.*, 2018).

Los datos de SNPs especie específicos se utilizaron también para confirmar la composición trihíbrida del anfidiplóide previamente descrita por marcadores SSR. Para ello, se registraron los SNP especie específicos y aquellos conservados entre el anfidiplóide y las especies silvestres que le dieron origen. La contribución de los alelos de las especies silvestres al genoma del anfidiplóide se calculó como el porcentaje de SNPs específicos comunes entre las especies silvestres y el anfidiplóide.

Finalmente, se realizó un análisis de asociación a priori entre la resistencia al carbón del maní y los marcadores SNPs mediante una regresión lineal simple. Los marcadores SNPs fueron definidos como la variable independiente y la incidencia como variable dependiente. Aquellos SNPs con  $R^2 P < 0.05$  fueron considerados como significativamente asociados al carácter.

## **Construcción de un mapa genético**

El mapa genético de la población interespecífica de RILs se realizó usando el paquete de R “ASMap” versión 2.0-0 Taylor y Butler, (2017). Los marcadores SNP y los individuos de la población se descartaron si contenían más del 10% de datos faltantes

usando comandos de R generados para este estudio. En el proceso de construcción de mapas genéticos, la estimación de las frecuencias de recombinación se realizó sobre los supuestos teóricos de herencia Mendeliana simple. Por ello, los marcadores se sometieron a un test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y corrección de Bonferroni para evaluar la desviación de la segregación esperada = 1:1 en una población de RILs. Los marcadores con valores de segregación esperada y el porcentaje mínimo de datos faltantes (10%) se constituyeron como los marcadores “estructurales”. Esos marcadores “estructurales” fueron considerados como altamente confiables para la construcción del mapa. Los marcadores colocados con algún otro ya asignado al mapa o con segregación distorsionada ( $P < 0.05$ ) fueron descartados en la construcción inicial del mapa. Sin embargo, luego de establecidos los grupos de ligamiento (GL), los marcadores antes descartados, fueron forzados a integrar los GL creados con los marcadores “estructurales”. Según lo recomendado en el procedimiento de “ASMap” para la construcción del mapa genético, se usó un mecanismo simple de contraste para determinar si los marcadores pertenecían a un mismo GL usando un valor  $P = 1e-6$  y una distancia de mapa  $< 35$  cM entre marcadores adyacentes (Taylor y Butler, 2017). Se usó la función de Kosambi para estimar la distancia genética en centiMorgan (cM) (Kosambi, 1944). En el proceso de construcción del mapa, se encontró una gran dificultad en la formación de los GL de los homeólogos A02 y B02, por ello se usaron para este proceso y para estos dos GL solo los SNPs mapeados en los cromosomas 2 de los genomas de referencia diploides y tetraploide (Bertioli *et al.*, 2016; Bertioli *et al.*, 2019). El mapa genético construido fue visualizado con el paquete de R Linkage MapView 2.1.2 (Ouellette *et al.*, 2018).

Para evaluar la concordancia entre el genoma de referencia de *A. hypogaea* cv. Tifrunner ([www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org)) y el mapa de ligamiento aquí construido, se comparó la distancia genética (cM) y la posición física Megapares de bases (Mbp) de cada SNP, usando el paquete de R MareyMap (Rezvoy *et al.*, 2007). La posición física de cada SNP se definió por búsqueda BLASTn sobre el genoma de referencia de *A. hypogaea* cv. Tifrunner Bertioli *et al.*, 2019, disponible en [www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org). Un GL se asignó a un cromosoma en particular cuando al menos el 90% de los SNPs estaban asignados a esa pseudomolécula. En un paso final de la construcción del mapa, se calcularon los valores del logaritmo de probabilidades (LOD, por sus siglas en inglés, *logarithm (base 10) of odds*) de a pares de marcadores, para las pruebas de ligamiento de  $r = 1/2$  (que es la

frecuencia máxima de recombinación esperada para marcadores ubicados en el mismo grupo de ligamiento). Las fracciones de recombinación fueron computadas para visualizar la calidad de la construcción de los GL del mapa genético, usando la función *heatMap* del paquete de R “ASMap”.

## **Análisis de QTL**

El análisis de QTLs y los efectos aditivos de los loci detectados se estimaron con el paquete de R *R/qtl* (Broman *et al.*, 2003; Broman y Sen, 2009). Los códigos alélicos (AA, AB y BB) de las matrices de datos genotípicos de las RILs y sus progenitores se recodificaron de la siguiente manera: homocigota como en el anfidiplóide = A y homocigota como en el progenitor cultivado = B. Para cada RIL se calcularon las medias de los valores fenotípicos (incidencia) observados en todas las repeticiones y en todos los años de ensayos a campo. Estos valores únicos obtenidos para cada RIL fueron los que se usaron para el análisis de QTLs. Las probabilidades condicionales de genotipo se calcularon considerando la información observada de los marcadores con un error de probabilidad = 0.001. Estas probabilidades condicionales establecen un genotipo probable en la ubicación definida de un pseudomarcador con una ventana de distancia arbitraria, que generalmente se establece en 1 cM para afinar la detección de loci asociados al fenotipo en estudio. Para modelar la regresión de marcadores + pseudomarcadores y el fenotipo se estableció una ventana de 1 cM.

Para evaluar la asociación de cada posición genómica con el carácter resistencia al carbón del maní se realizaron las regresiones según el modelo de Haley-Knott (H-K). El valor de corte del valor del logaritmo de probabilidades (LOD) se definió empíricamente usando 1000 permutaciones ( $\alpha = 0.01$ ) y, un QTL fue declarado como tal, cuando el valor de LOD fue mayor al valor de corte empírico (Churchill y Doerge, 1994). Los intervalos de confianza fueron calculados mediante dos métodos diferentes; por un lado, los intervalos Bayesianos de 95% de confianza se calcularon con la función *bayesint* y, por otro lado, el intervalo de soporte de LOD se calculó con la función *lodint*. Estos intervalos definen la región cromosómica que contiene al QTL en cM. También, se calculó el porcentaje de varianza explicado por cada QTL (PVE, por sus siglas en inglés) usando la función *fitqtl* mediante el ajuste de un modelo lineal simple con cada QTL detectado según lo implementado en *R/qtl* (Broman *et al.*, 2003). El porcentaje de reducción de incidencia

de carbón del maní se calculó por la diferencia de porcentaje de incidencia entre las clases genotípicas (AA = genotipo silvestre asociado a la resistencia ó BB = genotipo de *A. hypogaea* asociado a la susceptibilidad) en la posición de los QTL. Además, para evaluar la interacción de los loci detectados, se ajustó un modelo lineal QTL-QTL usando la función *addint* que considera la interacción entre los loci asociados a la resistencia al carbón del maní. Los QTL se nombraron de acuerdo a la nomenclatura convencional con la letra inicial q seguida por el nombre del carácter (aquí denominado SmI por *Smut Incidence*) y el GL.

Finalmente, se realizó un ANAVA y un test TukeyHSD con corrección de Bonferroni ( $P = 0.05$ ) para evaluar las diferencias de la incidencia al carbón entre los grupos de genotipos en las posiciones de los SNPs detectados en los picos de los QTLs.

### **Identificación de genes candidatos en los intervalos de los QTLs**

Los intervalos de los QTL se definieron entre las posiciones físicas de los marcadores identificados en los extremos de los intervalos de confianza definidos con la función *lod\_int* en el paquete R/qtl2 (Broman *et al.*, 2019). Las posiciones físicas se designaron de acuerdo a la secuencia del genoma de referencia *A. hypogaea* cv. Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019) disponible en [www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org). Con el fin de identificar genes candidatos que potencialmente estén regulando la resistencia al carbón, los modelos de genes se buscaron usando la plataforma InterMine (<https://mines.legumeinfo.org/peanutmine/begin.do>). La expresión de los genes definida como alta densidad de transcritos fue evaluada realizando un BLAST de las secuencias de cada uno de los genes encontrados en los intervalos de QTL. Las búsquedas de secuencias se realizaron en la base correspondiente a *A. hypogaea* cv. Tifrunner con la información del transcriptoma correspondiente (Clevenger *et al.*, 2016), disponible en <https://www.peanutbase.org>.

## **RESULTADOS**

### **Caracterización molecular del anfidiploide por SSR y SNPs**

La evaluación con 373 marcadores SSR, de los dos progenitores de las RILs y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide mostraron buena amplificación y polimorfismo. Unos pocos cebadores fallaron al no amplificar fragmentos en todas las muestras, amplificaron muchos fragmentos inespecíficos o de difícil interpretación, o amplificaron con muy baja fluorescencia en una o más muestras. En todos los casos se descartaron para el análisis. Treinta y ocho de los 373 marcadores presentaron alelos específicos para al menos alguna de las especies silvestres evaluadas (Tabla 5.1). Se contabilizaron en total 566 alelos específicos del genoma K (*A. batizocoi*) y 1072 alelos del genoma A (*A. cardenasii* y *A. correntina*). Los alelos para las especies del genoma A se contabilizaron en conjunto ya que el genoma A del anfidiplóide está constituido por la recombinación de los cromosomas de *A. correntina* y *A. cardenasii*. Además, la similitud entre las secuencias genómicas de las dos especies con genoma A es alta, lo que se evidencia por la elevada cantidad de alelos en común vs. la cantidad de alelos especie específicos detectados.

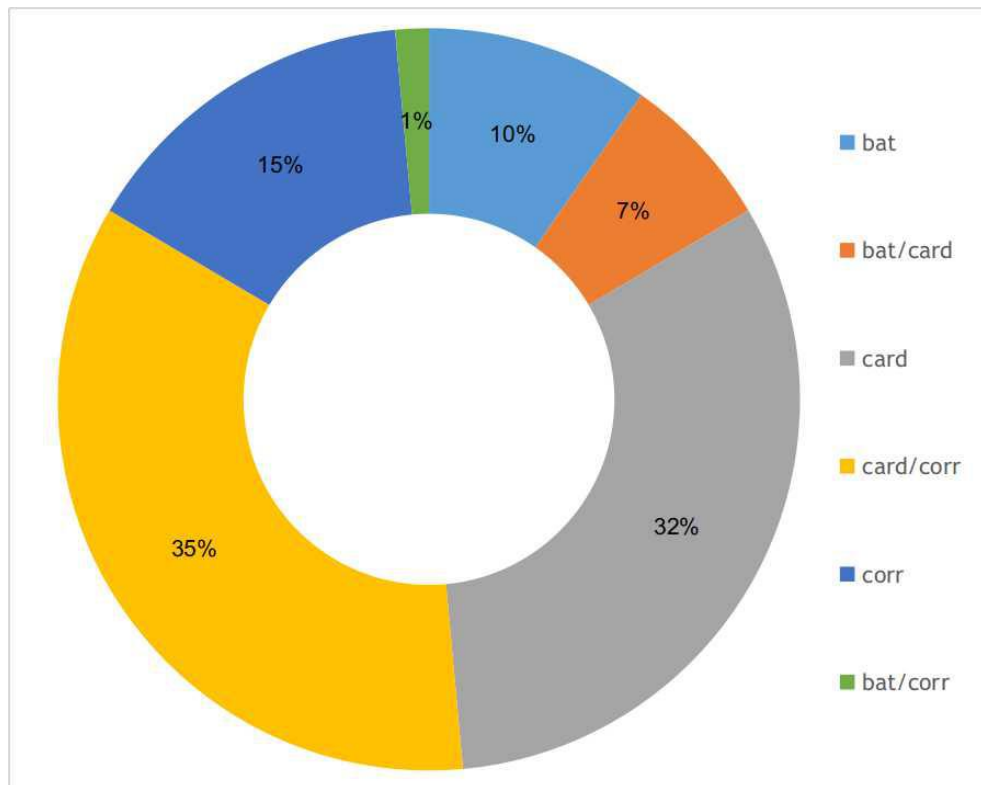
El set de 235 marcadores SSR mostró buena transferibilidad entre las especies silvestres diploides analizadas. Ocho marcadores amplificaron 24 alelos en el anfidiplóide que no pudieron ser atribuidos a ninguno de los progenitores silvestres. Los marcadores que revelaron alelos especie específicos de las tres especies silvestres diploides y que también fueron identificados en el genoma del anfidiplóide se presentan en la Tabla 5.2. El porcentaje de alelos con que contribuyó cada especie silvestre a la constitución genómica del anfidiplóide se muestra en la Figura 5.2. Si bien la proporción de alelos de las especies silvestres en el anfidiplóide no fue de acuerdo a lo esperado según la constitución genómica del anfidiplóide, estos marcadores confirmaron la condición trihíbrida del anfidiplóide con una constitución genómica  $KK A_{car} A_{cor}$ .

**Tabla 5.1** Alelos específicos de las especies silvestres, del anfidiplóide y compartidos entre las especies silvestres y el anfidiplóide

	<i>A. batizocoi</i>	<i>A. cardenasii</i>	<i>A. correntina</i>	Anfidiplóide
Total de alelos específicos	119	58	60	24
Alelos especie específicos amplificados en el anfidiplóide	20	66	32	

**Tabla 5.2** Marcadores que revelaron alelos especie específicos de las tres especies silvestres diploides de *Arachis* que fueron encontrados en el genoma del anfidiplóide

Especies	Marcadores
<i>A. correntina</i>	NPRL-Ah1TC6E01, NPRL-AHBGS11002B03, NPRL-cont00058a, NPRL-cont00095a, NPRL-cont00151a, NPRL-cont00176b, NPRL-cont00250a, NPRL-cont00710a, NPRL-cont00834a, NPRL-cont00981b, NPRL-cont01078a, NPRL-cont01356a, NPRL-cont01409a, NPRL-cont01663a, NPRL-cont02426a, NPRL-Indel-003, NPRL-RN2C06
<i>A. batizocoi</i>	NPRL-ABCLW, NPRL-Ah-229, NPRL-cont01065a, NPRL-cont02904a, NPRL-gi-832, NPRL-RN2F12
<i>A. cardenasii</i>	NPRL-Ah1TC11A02, NPRL-Ah1TC9F04, NPRL-cont00125a, NPRL-cont00318a, NPRL-cont00523a, NPRL-cont00629b, NPRL-cont00644a, NPRL-cont00843a, NPRL-cont01310a, NPRL-cont01611a, NPRL-cont01924a, NPRL-cont02125a, NPRL-gi-30419385, NPRL-gi-560, NPRL-Indel-020, NPRL-RM15C11



**Fig. 5.2** Gráfico de anillo mostrando el porcentaje de contribución alélica de los progenitores silvestres a la constitución genómica del anfidiplóide revelada con 235 marcadores SSR. Las combinaciones bat/ card (7%), card/ corr (35%) y bat/ corr (1%) muestran la contribución de los alelos que fueron compartidos en cada par de especies silvestres. Abreviaciones: bat: *A. batizocoi*, card: *A. cardenasii*, corr: *A. correntina*.

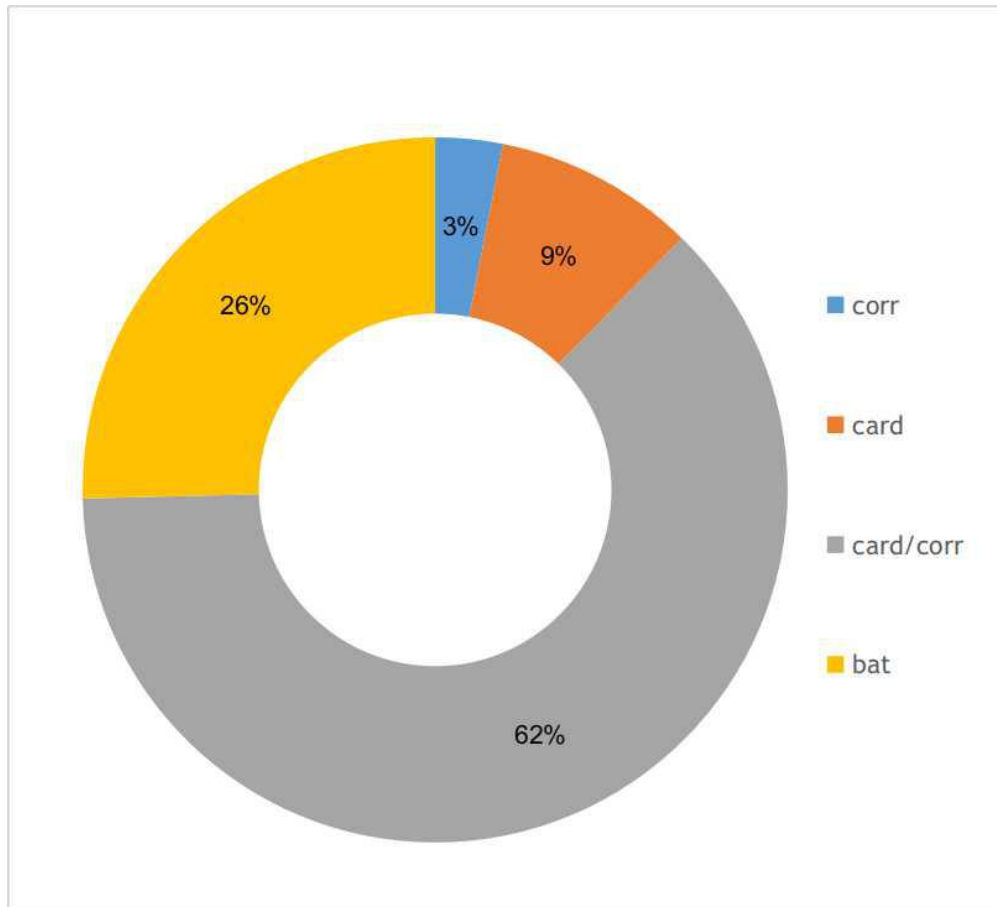
La evaluación con la plataforma 48K Axiom\_*Arachis2* SNP de los dos progenitores de las RILs y de las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide permitió identificar

220 SNPs específicos de las especies silvestres, del anfidiplóide y compartidos entre las especies silvestres y el anfidiplóide. En la Tabla 5.3, se observan los SNPs específicos para las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide y que fueron comunes con este último. La detección de estos alelos compartidos entre las especies silvestres y el anfidiplóide confirmaron la constitución trihíbrida del mismo (Figura 5.3). De igual modo que con los marcadores SSR la proporción de alelos de las especies silvestres en el anfidiplóide no fue de acuerdo a lo esperado según la constitución genómica del mismo. Aun así, estos marcadores confirmaron la condición trihíbrida del anfidiplóide con una constitución genómica  $KK A_{car} A_{cor}$ .

**Tabla 5.3** SNPs específicos de las especies silvestres, del anfidiplóide y compartidos entre las especies silvestres y el anfidiplóide

	<i>A. batizocoi</i>	<i>A. cardenasii</i>	<i>A. correntina</i>
Total de SNPs específicos	1139	98	99
SNPs especie específicos amplificados en el anfidiplóide	148	54	18





**Fig. 5.3** Gráfico de anillo mostrando el porcentaje de contribución alélica de los progenitores silvestres a la constitución genómica del anfidiplóide revelada con 220 marcadores SNPs. Las combinaciones card/corr (62%) muestran la contribución de los alelos que fueron compartidos entre *A. cardenasii* y *A. correntina*. Abreviaciones: bat: *A. batizocoi*, card: *A. cardenasii*, corr: *A. correntina*.

## Genotificado con SNP y mapeo genético de la población de RILs

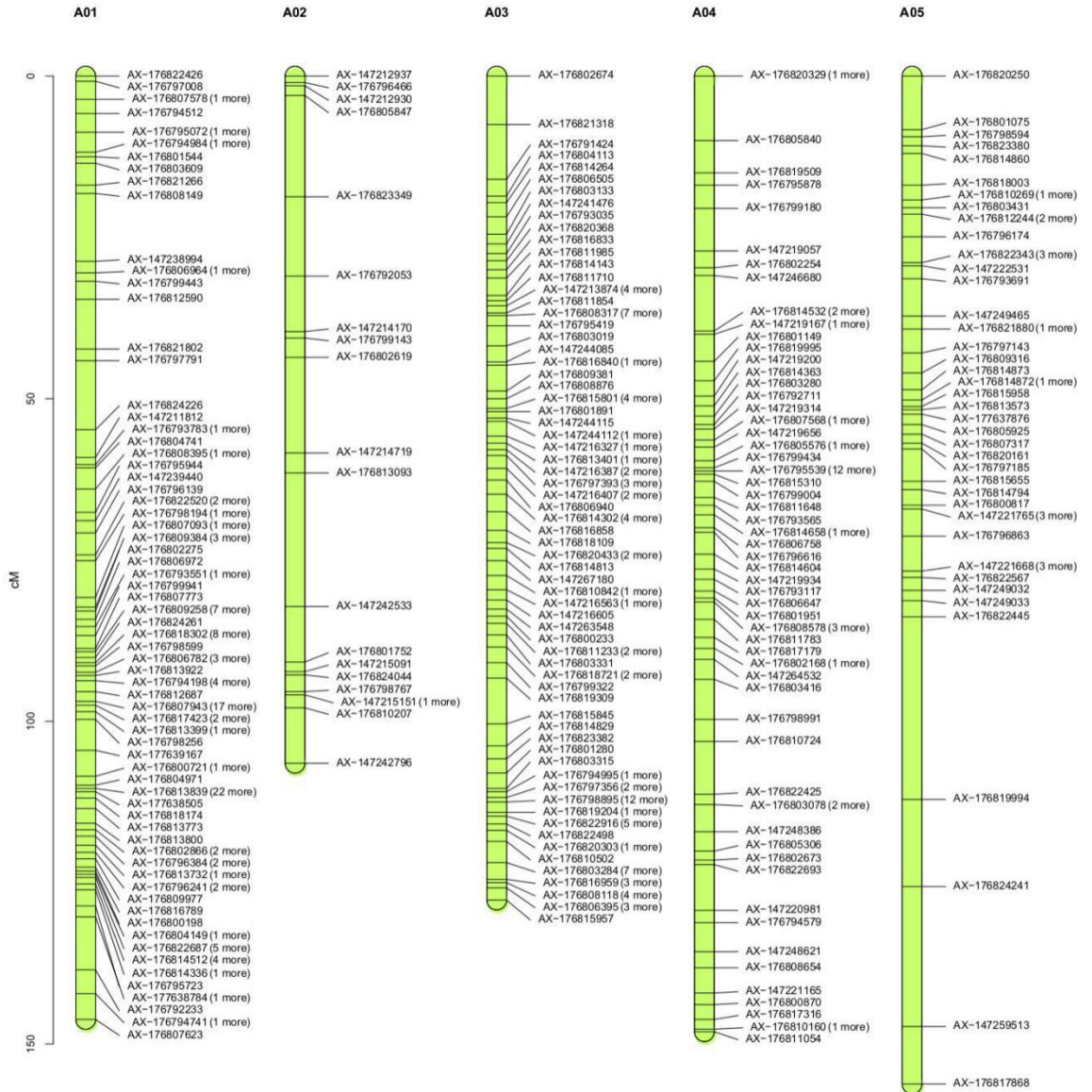
El genotificado con la plataforma 48K Axiom\_*Arachis*2 SNP de las 103 RILs, líneas parentales, de los progenitores silvestres y del anfidiplóide resultó en un total de 7496 marcadores SNP polimórficos (15.62%), 3662 asignados al genoma A y 3834 a los genomas B/K. En las mismas se encontraron cantidades distintas de marcadores especie específicos de las especies diploides progenitoras del anfidiplóide: 99 SNP para *A. correntina* (genoma A), 98 para *A. cardenasii* (genoma A), 123 en común entre estas especies del genoma A y 1139 para *A. batizocoi* (genoma K). Además, un total de 3456 SNP fueron específicos para *A. hypogaea* (1268 con E-valor  $<10e-20$  coincidencias en el subgenoma A y 2158 E-valor  $<10e-20$  coincidencias en el subgenoma B).

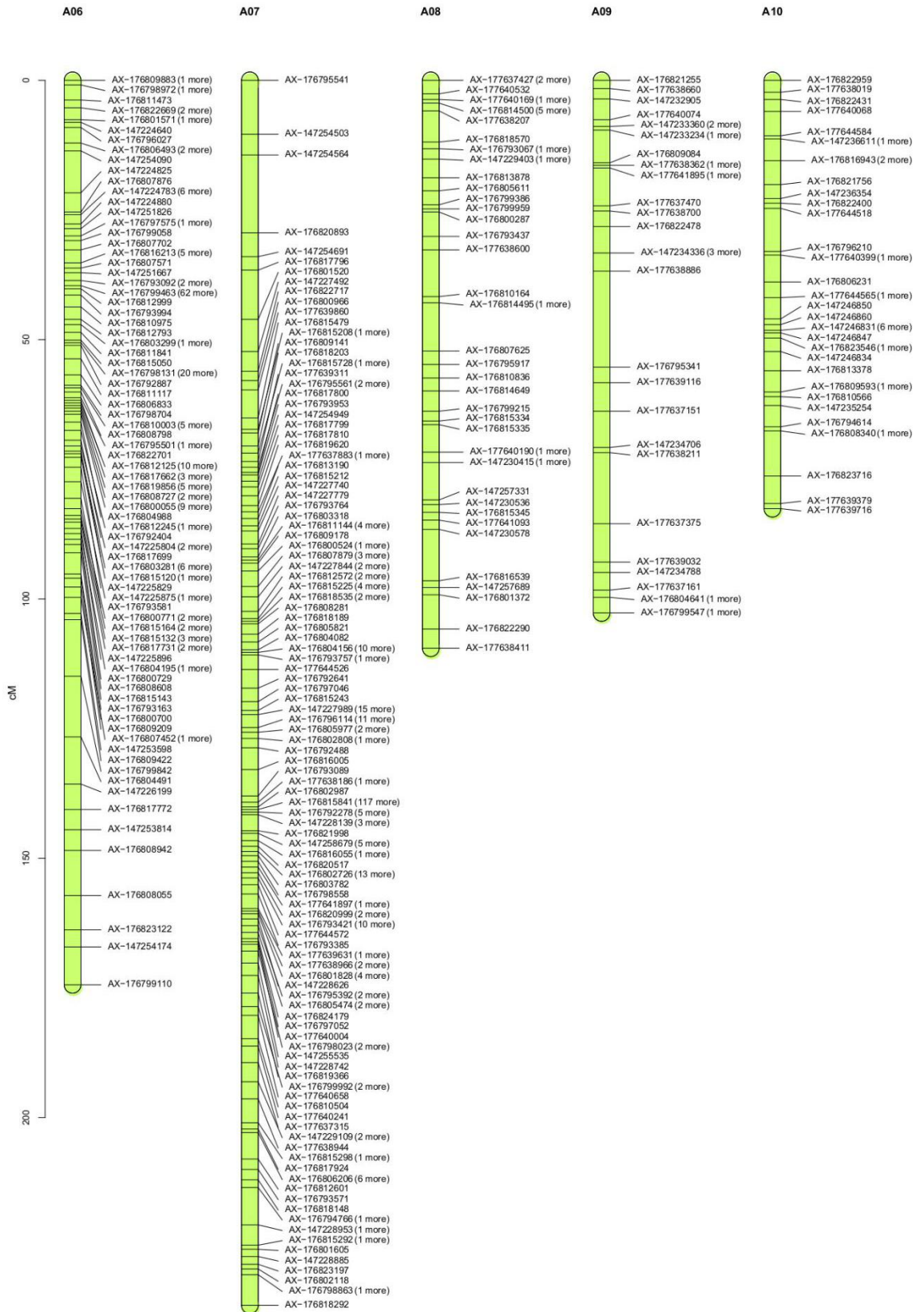
La mayoría de los SNP se heredaron según lo esperado para segregación disómica, excepto por 209 SNP, que presentaron patrones gráficos de segregación más compatibles con la segregación tetrasómica de acuerdo a lo observado previamente por Clevenger *et al.*, 2017. El 56% de los marcadores evidenciaron segregación distorsionada  $P < 0.001$ . Los mismos, se distribuyeron en unos pocos grupos discretos en los GL: A04, A05, A07, B03 y B04 (Anexo 5.2). Se consideraron como regiones de segregación distorsionada (SDR, por sus siglas en inglés) a aquellas que presentaron al menos cuatro marcadores con distorsión ligados. El mapa se construyó en dos pasos. En el primero, se seleccionó un set de 918 “marcadores estructurales”, es decir aquellos que no presentaron distorsión y no estaban co-localizados con otros marcadores. Mientras que, en un segundo paso, se integraron 889 marcadores co-localizados y con distorsión de hasta una relación 4:1, a los GL formados en la etapa previa. Esta integración se realizó bajo la premisa que la incorporación de los nuevos marcadores no cambiara el orden original de los “marcadores estructurales” ni la distancia total del mapa.

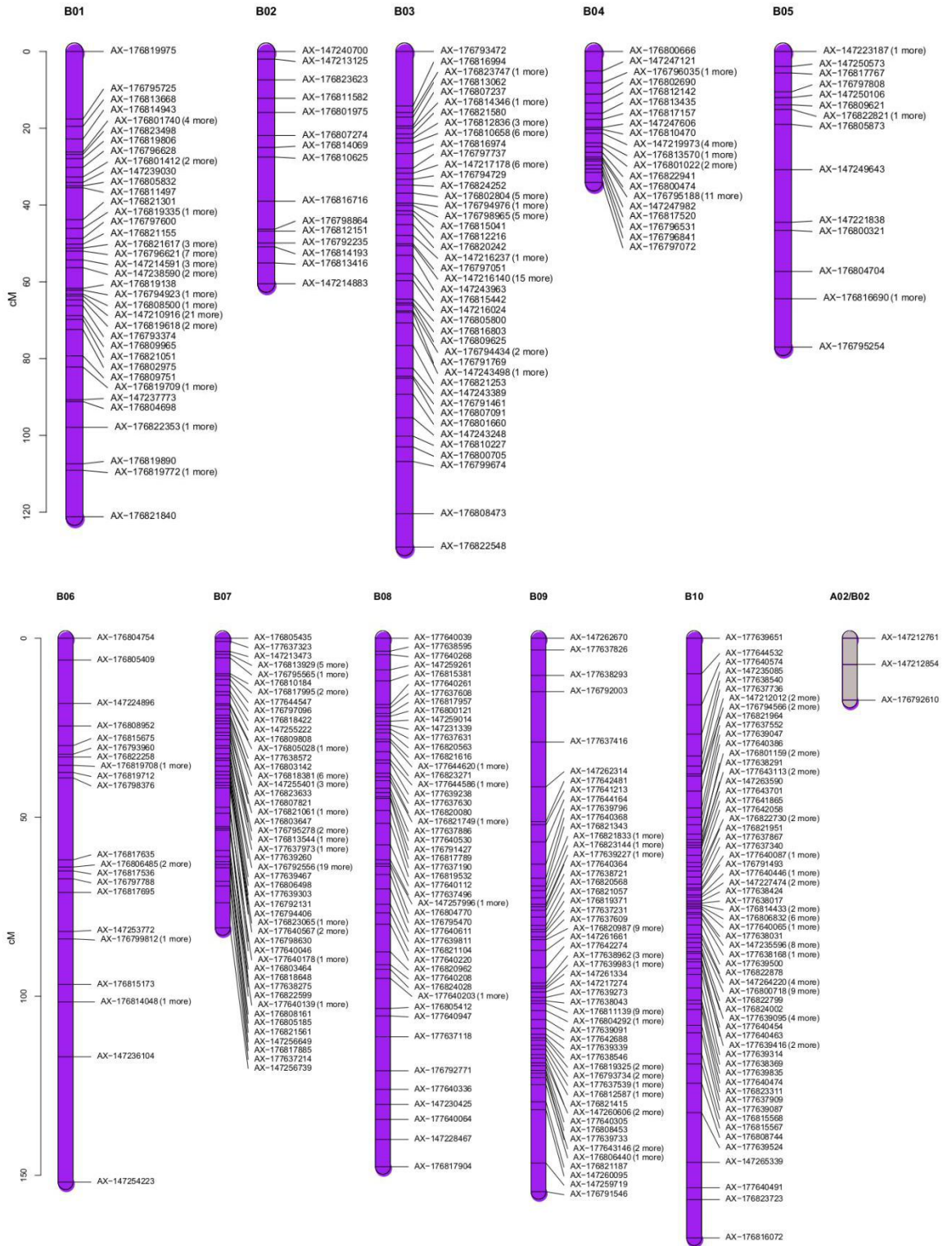
La posición física de los marcadores de los subgenomas A y B se definió mediante la herramienta BLASTn, de acuerdo a la secuencia de referencia de *A. hypogaea* cv. Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019), disponible en <https://www.peanutbase.org>. El mapa final estuvo compuesto por 1819 SNP asignados a 20 cromosomas del maní. El mapa abarcó una distancia genética total de 2531,81 cM (Tabla 5.4; Figura 5.4). El mapa de ligamiento se ordenó en 21 GL de los cuales 20 fueron asignados a un subgenoma particular (A ó B) y un GL corto perteneciendo al par de homeólogos 2 que se mantuvo como un fragmento independiente sin asignación a ningún subgenoma. Este fragmento, denominado GL

A02/B02, fue conservado como parte del mapa de ligamiento ya que contenía dos SNPs significativamente asociados a la incidencia de carbón. La longitud de los GL varió desde 17,28 cM (GL A02/B02) a 236,22 cM (GL A07). La distancia promedio entre marcadores adyacentes fue de 1,41 cM y varió desde 0,66 cM (GL A07) a 6,08 cM (GL B06). El número de marcadores mapeados en cada grupo de ligamiento varió de 15 (GL B02) a 357 (GL A07). Los nombres de los grupos de ligamiento se asignaron de acuerdo a la pertenencia de los SNP a las diferentes pseudomoléculas, luego de efectuado un BLASTn sobre la secuencia de referencia de *A. hypogaea*. La única excepción fue el GL A02/B02, con 3 SNPs y 17,29 cM, que no pudo ser asignado a una pseudomolécula de un subgenoma particular. Por ello, el nombre se asignó con ambas letras representativas del genoma (A y B). Del total de marcadores mapeados un 11,5% de los marcadores presentaron asignaciones a los subgenomas A y B cruzadas con respecto al genoma de referencia (marcadores polimórficos que no coinciden con la asignación original a los subgenomas A o B según la plataforma 48K ‘Axiom\_*Arachis2*’ SNP array (Clevenger *et al.*, 2018).

Luego del análisis de asociación por regresión lineal simple, se encontraron 236 SNPs estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) en los GL A01, A03, A07, A08, A02/B02, B02, B03 y B09 (Anexo 5.3).







**Fig. 5.4** Mapa de ligamiento construido para la población de 103 RILs derivadas del cruzamiento de *A. hypogaea* JS17304-7-B × el anfiploide artificial JS1806. Los 1819 SNPs se muestran a la derecha de los 21 grupos de ligamiento (GL) y el número de marcadores co-localizados se indican entre paréntesis (n° *more*). Cada marcador está denominado por su nombre provisto por la información de la plataforma 48K Axiom\_*Arachis2* SNP array (Clevenger *et al.*, 2018). Los GL del subgenoma A están representados en verde y los GL del subgenoma B en violeta, el GL y el GL A02/B02 sin asignación específica de genoma está representado en gris. Las barras en el eje y representan la distancia en cM.

**Tabla 5.4** Estadísticas de resumen para el mapa genético obtenido mediante el análisis de una población de 103 RILs. El número de marcadores por grupo de ligamiento (GL) está expresado en números absolutos; la longitud de mapa en Mbp, el espaciado promedio entre marcadores adyacentes y la distancia máxima entre marcadores están expresadas en cM. Las medidas totales expresan: <sup>a</sup>Total de marcadores mapeados. <sup>b</sup>Distancia total del mapa genético en cM.

GL	Nº de SNPs mapeados	Longitud de mapa (Mbp)	Distancia promedio (cM)	Distancia máxima (cM)
A01	168	146,24	0,88	10,68
A02	20	106,51	5,61	20,70
A03	144	127,67	0,89	8,52
A04	83	148,15	1,81	10,02
A05	54	156,16	2,95	28,25
A06	239	174,40	0,73	11,69
A07	357	236,22	0,66	14,96
A08	49	109,45	2,28	9,93
A09	35	102,70	3,02	18,53
A10	44	82,60	1,92	8,79
B01	87	121,19	1,41	17,57

GL	N° de SNPs mapeados	Longitud de mapa (Mbp)	Distancia promedio (cM)	Distancia máxima (cM)
B02	15	60,51	4,32	11,51
B03	90	129,12	1,45	14,25
B04	39	34,08	0,90	5,13
B05	17	76,96	4,81	13,76
B06	26	151,94	6,08	35,00
B07	95	80,95	0,86	7,01
B08	54	147,56	2,78	9,50
B09	89	154,61	1,76	14,92
B10	111	167,51	1,52	13,91
A02/B02	3	17,29	8,64	10,02
<b>Total</b>	<b>1819<sup>a</sup></b>	<b>2531,81<sup>b</sup></b>		

### Evaluación del mapa genético

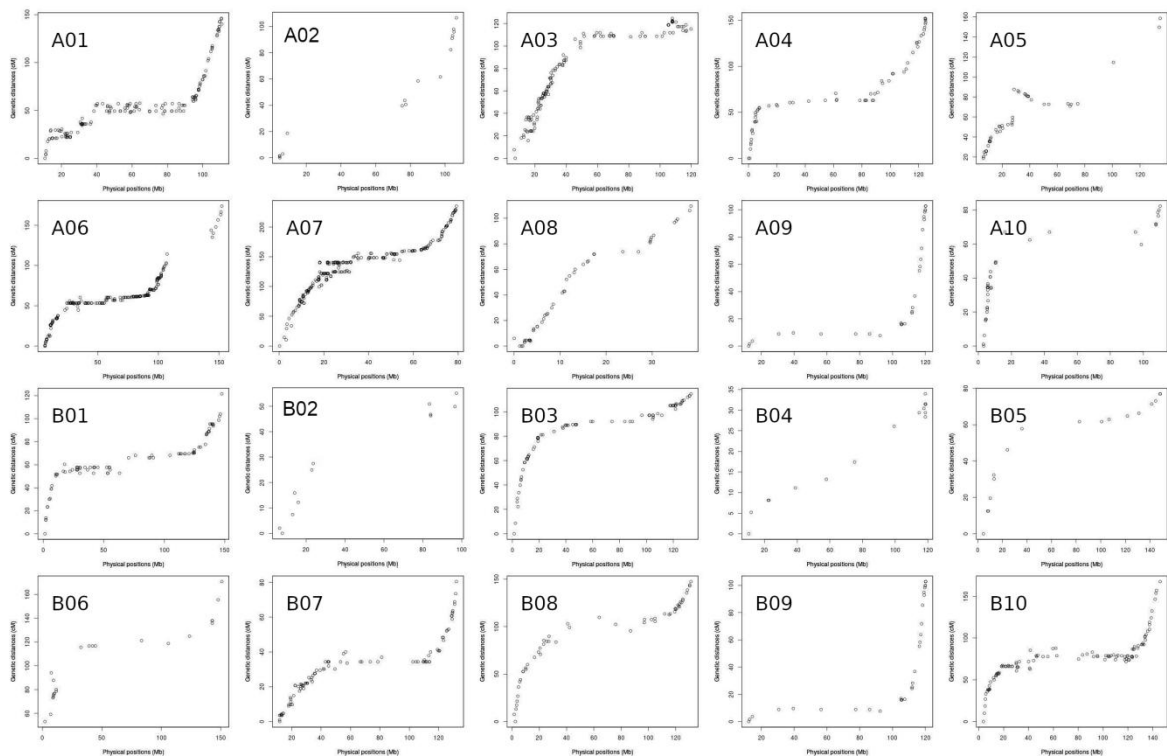
Los marcadores posicionados en el mapa genético mostraron una correlación relativamente alta con la posición física publicada para la secuencia de referencia tetraploide *A. hypogaea* cv. Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019, [www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org)). Los 1819 *loci* fueron asignados a las pseudomoléculas con un intervalo promedio de distancia física de 1,39 Mbp entre los *loci* y un total de 2527,56 Mbp. El promedio de distancia estimada por frecuencia de recombinación fue de 3,59 cM/Mbp con un valor máximo de 17,16 cM/Mbp (A07). Los GL A10, B03, B04, B05 y B06 mostraron las frecuencias de recombinación más bajas por Mbp (0.21, 0.9, 0.14, 0.84, 0.01 cM/Mbp, respectivamente). En la mayoría de los casos, los *loci* estuvieron distribuidos de manera uniforme a lo largo de los cromosomas, pero en otros (A02, A05, B07), el análisis mostró una mayor densidad de marcadores y mayor frecuencia de recombinación en las porciones distales de los brazos del cromosoma comparado con las regiones pericentroméricas.

El análisis de colinearidad entre las posiciones en el mapa genético construido para las RILs y las posiciones físicas de las pseudomoléculas en el genoma de referencia de *A.*

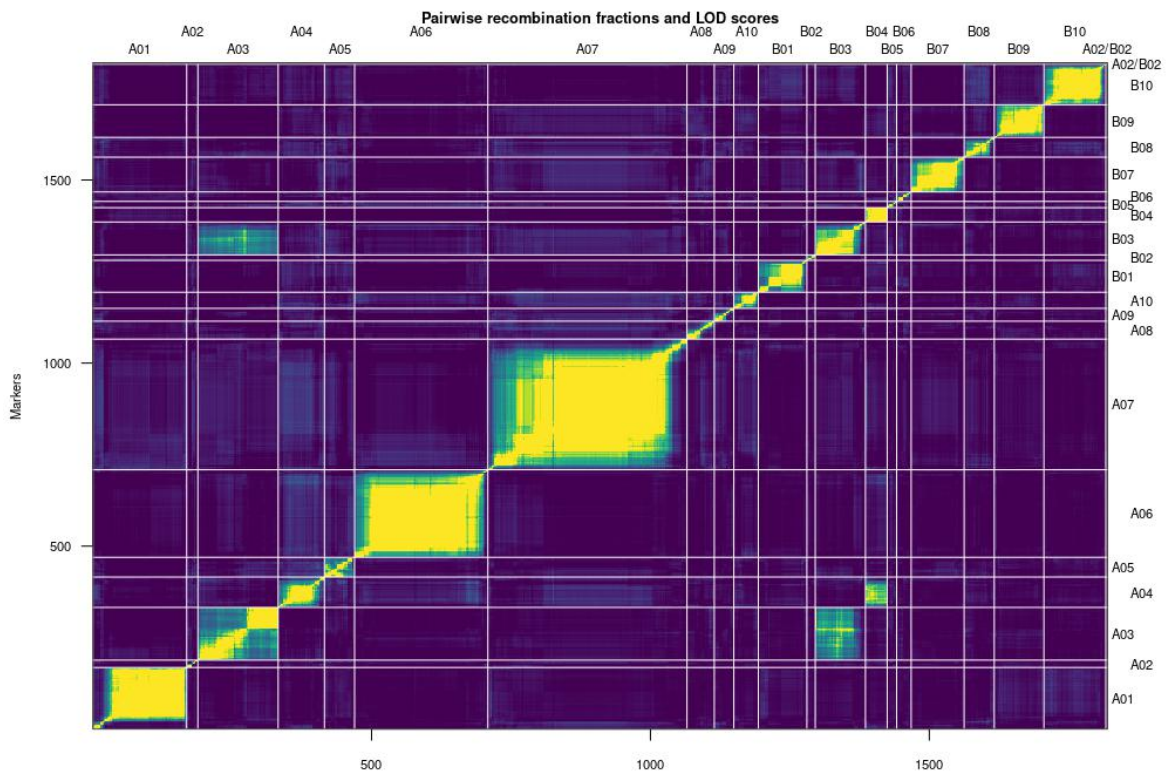


*hypogaea* mostró una buena concordancia para todos los GL (Figura 5.5). La única excepción fue un grupo de marcadores localizados en el segmento localizado entre los 76-88 cM del cromosoma A05, que formaron una línea en arco relativo a los demás marcadores en el GL como se indica en la Figura 5.5. La formación de arcos en estos gráficos se debe a que los marcadores en el mapa genético presentan una orientación opuesta con respecto al mapa físico. Esto se interpreta como la existencia de una inversión en los GL de los materiales aquí analizados con respecto al material a partir del cual se construyó el mapa físico de referencia.

El análisis de recombinación de a pares de marcadores *versus* los valores de LOD (Figura 5.6) reflejó un fuerte ligamiento entre cada par de marcadores dentro de un mismo GL. Este hecho corrobora la correcta asignación de los marcadores a cada GL, excepto para algunos marcadores que parecen estar asociados en los GL A03/B03 y GL A04/B04.



**Fig. 5.5** Análisis de colinearidad entre la posición genética de todos los grupos de ligamiento con la posición física de los mismos en las secuencias genómicas de referencia. En el eje *x* se indica la posición física de los marcadores SNPs en el genoma de referencia de *A. hypogaea*, mientras que el eje *y* se representa la distancia genética entre los marcadores SNP en cM en el mapa de las RILs.



**Fig. 5.6** Gráfico de las fracciones de recombinación (diagonal superior) y valores de LOD para las pruebas de ligamiento de  $r = 1/2$ , que es la máxima frecuencia de recombinación esperada para marcadores ubicados en el mismo grupo de ligamiento (diagonal inferior). El color amarillo indica ligamiento entre los pares de marcadores, mientras que el azul indica pares de marcadores no ligados ( $r = 1/2$ ).

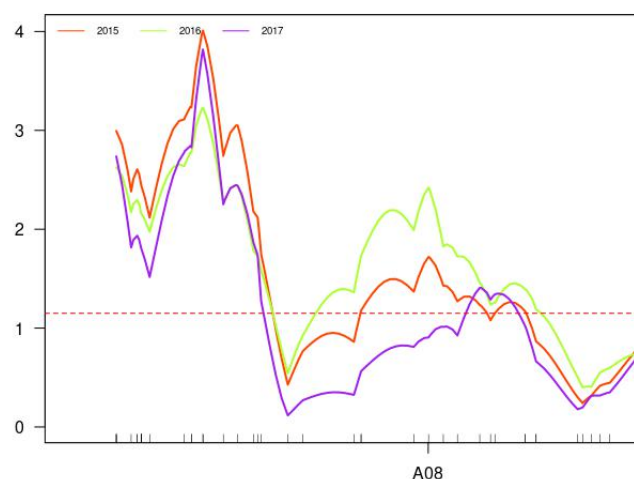
### QTL para la resistencia al carbón del maní

El análisis de QTL identificó regiones con LOD significativo en los cromosomas A01, A07, B02, B03 y B09 en al menos dos de los tres años de evaluación de la enfermedad. Sin embargo, solo dos regiones cromosómicas (A08, A02/B02) se identificaron significativamente asociadas con la incidencia de carbón del maní, registrada a lo largo de tres años de evaluaciones a campo (Tabla 5.5; Figura 5.7). La posición física aproximada de los QTL fue definida por la posición del marcador genético más cercano. El QTL qSmIA08 fue detectado en el GL A08 a los 15,20 cM (AX-147229403, 5,03 Mbp) (MAF = 0,50), mientras que el qSmIA02/B02 fue detectado a los dos cM del inicio del GL A02/B02 (AX-147212854, 3,56 Mbp) (MAF = 0,48). Ambos QTL mostraron valores de LOD por encima del valor de corte empírico P-valor = 0,01 (Tabla 5.6; Figura 5.8). El

ANAVA y test de TukeyHSD con corrección de Bonferroni ( $P = 0,05$ ) mostró diferencias estadísticamente significativas de incidencia de carbón del maní entre los grupos de genotipos en las posiciones de los SNPs AX-147229403 y AX-147212854. El análisis de los haplotipos para esos SNPs mostró independencia de los QTLs. El análisis del efecto genotípico de los marcadores fuertemente asociados a los QTL reveló que la mayoría de las RILs (86%) con alelos del anfidiplóide tenían los valores medios de incidencia más bajos, mientras que las RILs con alelos de *A. hypogaea* tenían valores de incidencia significativamente más altos ( $P = 0,05$ ).

**Tabla 5.5** Análisis por año de los QTLs asociados a la resistencia al carbón del maní detectados en una población interespecífica de RILs de *Arachis* con en el modelo de regresión Halley-Knott. La resistencia al carbón del maní se estimó por el nivel de la variable transformada: raíz cuadrada de la incidencia. Los resultados se presentan por año de evaluación a campo indicando el grupo de ligamiento (GL), la posición en el mapa genético en Kosambi cM para cada grupo de ligamiento y el Valor de LOD en el pico del QTL.

Año	GL	Posición genética	LOD
2015	A08	15,2	4,22
	A02/B02	4	2,24
2016	A08	15,2	3,45
	A02/B02	4	2,73
2017	A08	15,2	4
	A02/B02	4	1,49



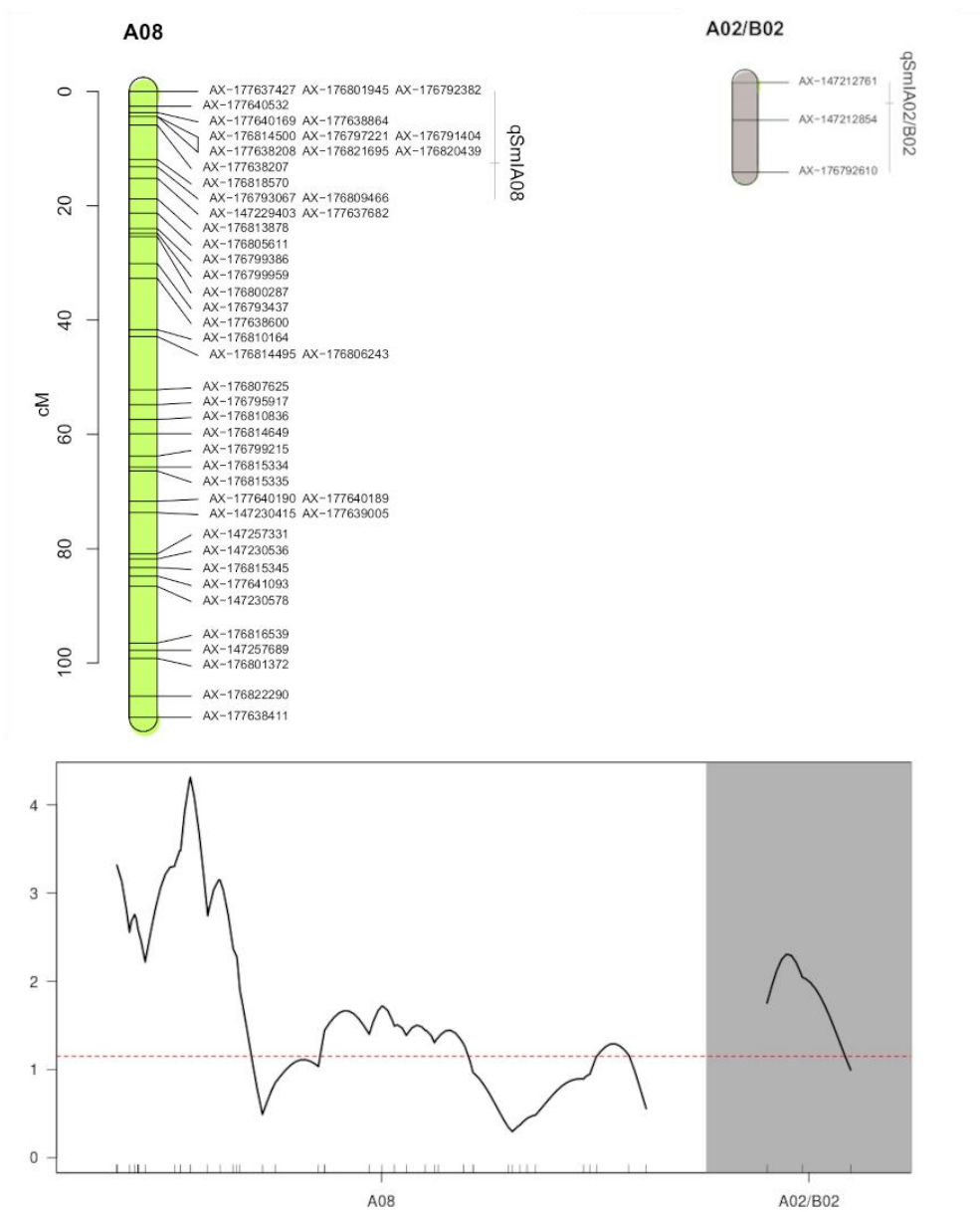
**Fig. 5.7** Valores de LOD detectados en los cromosomas A08 y A02/B02 luego del análisis de detección de QTL por año. Línea naranja: 2015, línea verde: 2016 y línea

púrpura: 2017. La línea punteada de color rojo indica el valor de corte de LOD empírico promedio para los tres años y los dos grupos de ligamiento con un P-valor < 0.05.

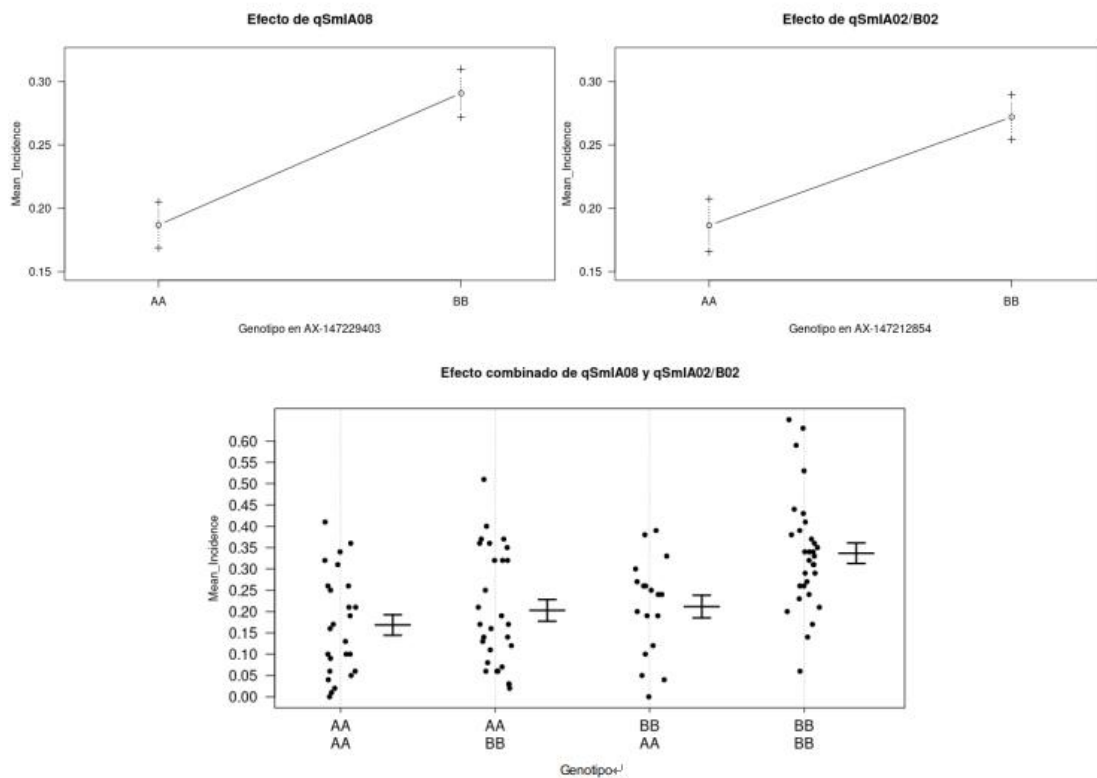
La reducción significativa ( $P < 0.01$ ) de la incidencia al carbón del maní por cada QTL individual y combinados se muestran en la Figura 5.9. Los valores de los efectos aditivos detectados para cada QTL (Tabla 5.6) sugieren que esos segmentos genómicos contribuyen en la reducción de un 40,87 % y 32,07 %, respectivamente. El análisis de los dos QTLs en simultáneo, mostró que cuando las RILs portaban ambos alelos del progenitor anfidiplóide ( $qSmIA08 = AA$  y  $qSmIA02/B02 = AA$ ) se produjo un 56% de disminución de la incidencia de la enfermedad ( $P < 0,001$ ) ((Figura 5.9, Tabla 5.7). Las diferencias de incidencia entre RILs que portaban alelos AA en  $qSmIA08$  y BB en  $qSmIA02/B02$  y *vice versa* fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 5.6** Detalle de los QTL detectados en una población interespecífica de RILs de *Arachis* con en el modelo de regresión Halley-Knott. La resistencia al carbón del maní fue estimada por el nivel de la variable transformada: raíz cuadrada de la incidencia. <sup>a</sup>Grupo de ligamiento. <sup>b</sup>Posición en el mapa en Kosambi cM para cada grupo de ligamiento. <sup>c</sup>Posición física basada en la secuencia de referencia de *A. hypogaea* cv. Tifrunner Bertioli *et al.*, 2019, disponible en <https://www.peanutbase.org>. <sup>d</sup>Valor de LOD en el pico del QTL. <sup>e</sup>Valor de corte del LOD empírico obtenido con 1000 permutaciones con un nivel de 1% de significancia. <sup>f</sup>Intervalos Bayesianos de 95% de confianza. <sup>g</sup>Intervalo de soporte de LOD. <sup>h</sup>Valores del efecto aditivo, valores positivos indican que los alelos provienen de uno de los genomas silvestres A (*A. correntina* ó *A. cardenassi*) ó K (*A. batizocoi*) y los valores negativos indican que los alelos provienen de la línea experimental *A. hypogaea* JS17304-7-B. <sup>i</sup>Proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL. <sup>j</sup>Porcentaje de disminución (%) de la incidencia al carbón del maní.

GL <sup>a</sup>	Posición genética <sup>b</sup>	Posición física <sup>c</sup>	Marcador SNP más cercano	LOD <sup>d</sup>	LOD de corte <sup>e</sup>	Intervalo Bayes <sup>f</sup>	Intervalo LOD <sup>g</sup>	Efecto aditivo <sup>h</sup>	PVE <sup>i</sup>	% <sup>j</sup>
A08	15,2	5,03	AX-147229403	4,31	2,04	0 - 71,72	0 - 18,78	0,12	17,52	40,87
A02/B02	4	3,56	AX-147212854	2,31	1,15	0 - 17,28	0 - 17,28	0,105	9,06	32,07



**Fig. 5.8** QTL para la resistencia al carbón del maní A: detalle de los grupos de ligamiento A08 y A02/B02 mostrando los segmentos genómicos entre los intervalos (*lodint*) del QTL como barras verticales y el pico como una línea horizontal. El eje *y* indica la distancia genética. El nombre de los marcadores está definido por la información de la plataforma *Axiom\_Arachis2* SNP array y se muestran a la derecha de cada grupo de ligamiento. B: curva de valores de LOD por grupo de ligamiento (A08 y A02/B02); la línea punteada de color rojo indica el valor de corte de LOD empírico ( $P < 0,01$ ).



**Fig. 5.9** Efecto fenotípico de los marcadores SNPs estrechamente ligados a los QTL que contribuyen a la resistencia del carbón del maní A: efecto del genotipo en la posición del marcador AX-147212854. B: efecto del genotipo en la posición del marcador AX-147229403. C: efecto combinado de ambos genotipos en la posición de los marcadores AX-147212854 and AX-147229403. AA y BB corresponden a los genotipos del anfidiplóide y de la línea experimental de *A. hypogaea*, respectivamente.

**Tabla 5.7** Comparaciones de a pares entre grupos de RILs portando diferentes combinaciones de alelos (AA - BB) en la posición de los SNPs en los picos de qSmIA08 y qSmIA02/B02. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un test de TukeyHSD luego de un ANOVA = Incidencia ~ AX-147229403 + AX-147212854. La comparación de a pares<sup>a</sup> se realizó para las medias de incidencia de carbón del maní de 103 RILs en las posiciones de los SNPs AX-147229403 y AX-147212854. Las diferencias<sup>b</sup> se computaron entre los valores de incidencia de los grupos comparados denominados por el código del QTL y el genotipo como superíndice. P-valor<sup>c</sup> del test de TukeyHSD ( $\alpha = 0,05$ ).

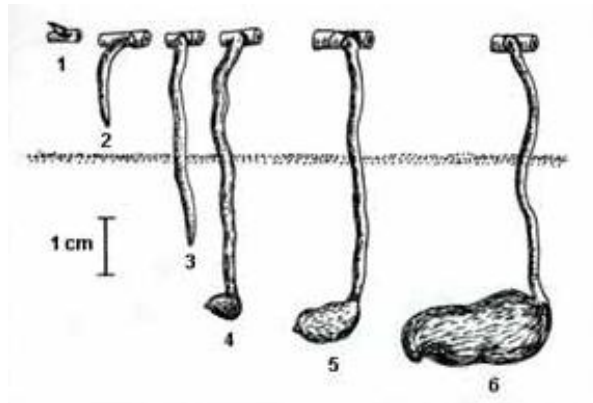
Comparación de a pares <sup>a</sup>	Diferencias <sup>b</sup>	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior	P-valor <sup>c</sup>
qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup> - qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup>	0,09	-0,01	0,19	0,08
qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup> - qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup>	0,05	-0,04	0,14	0,51
qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup> - qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup>	0,19	0,11	0,28	0,00
qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup> - qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup>	-0,04	-0,14	0,05	0,64
qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>AA</sup> - qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup>	0,10	0,01	0,20	0,02
qSmIA08 <sup>AA</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup> - qSmIA08 <sup>BB</sup> qSmIA02/B02 <sup>BB</sup>	0,15	0,06	0,23	0,00

### Identificación de genes candidatos de resistencia al carbón del maní

El análisis de los intervalos físicos de los dos QTL en el genoma del maní mostró que estos se encuentran dentro de “puntos calientes” de genes de resistencia y de respuesta de defensa. En el intervalo de qSmIA08, se identificaron ocho modelos de genes anotados con función de resistencia a enfermedades. Estos genes incluyeron dominios repetidos ricos en leucina (NBS-LRR), dominios tipo meristema no apical (NAM), dominios de genes involucrados en procesos de resistencia pre-infección (ATAF, ATAF2 y CUC2), dominios proteicos NAC, y tres loci de dominios proteicos de resistencia a Mildiu (MLO) (Anexo 5.4). En el intervalo de qSmIA02/B02, se identificaron 31 modelos de genes anotados en el genoma B con función de resistencia a enfermedades. Entre estos últimos, seis codifican para proteínas de resistencia (clases TIR-NBS-LRR), 23 corresponden a dominios proteicos de resistencia LRR/NB-ARC y dos a proteínas no caracterizadas de resistencia a enfermedades (Anexo 5.4). El intervalo de qSmIA02/B02 en el genoma A se identificaron siete modelos de genes anotados, incluyendo dos dominios proteicos de resistencia LRR/NB-ARC y cinco modelos de genes de proteínas de resistencia a enfermedades (Anexo 5.4).

La búsqueda de alta densidad de transcriptos para esos 44 genes anotados con función de defensa a patógenos o resistencia putativa en los transcriptomas de *A. hypogaea* cv. Tifrunner. Clevenger *et al.*, (2016) indicó que todos los genes (excepto dos) se expresan en tejido reproductivo entre los estados fenológicos ginóforo aéreo (momento en que el clavo aéreo comienza su crecimiento geotrópico, denominado por Clevenger *et al.*, (2016) como *peg basipetal*) y clavado del ginóforo (momento en que el ginóforo se ha introducido en el

suelo y comienza a desarrollarse el fruto, denominado por Clevenger *et al.*, (2016) como *platee 1*) (Fig 5.10).



**Fig. 5.10** Esquema del desarrollo del fruto de *A. hypogaea* según Smith, (1950): 1 = ovario en el momento de la singamia; 2 = ginóforo aéreo; 3 = clavado del ginóforo; 4 = comienzo del crecimiento del fruto; 5 = estados tempranos del crecimiento del fruto; 6 = fruto inmaduro.

## DISCUSIÓN

### Caracterización molecular del anfidiplóide

El análisis general de los marcadores SSR y SNP demostraron que las tres especies silvestres contribuyeron a la constitución del genoma del anfidiplóide, confirmando su naturaleza trihíbrida. La detección de alelos *novel* como los identificados en el anfidiplóide no es inusual en los híbridos complejos de *Arachis*. El porcentaje de alelos *novel* detectados (4,15%) fue similar al porcentaje detectado en una retrocruza 1 (BC1) (5%) derivada del cruzamiento entre *A. hypogaea* y el híbrido complejo TxAG-6 (Burow *et al.*, 2001).

La obtención de este anfidiplóide trihíbrido con especies no tan cercanas al maní, como las que se han utilizado en otros anfidiplóides que incluyeron por ejemplo *A. ipaënsis* and *A. duranensis* (Fávero *et al.*, 2005) es muy significativa para ser utilizada como fuente potencial tetraploide de nuevos alelos para el cultivo. Esto es particularmente importante para los genes de resistencia, ya que los mejores comportamientos frente a



diferentes pestes que atacan al maní se han visto en especies que presentan una distancia genética moderada con el cultivo (Stalker *et al.*, 2016; Stalker, 2017). Sin embargo, el éxito de la introgresión de nuevos alelos en el maní, no sólo depende de la superación de la barrera impuesta por las diferencias de ploidía entre las especies diploides y el cultígeno, sino que también es esencial la recombinación efectiva de los anfidiploides artificiales con el maní. La introgresión efectiva de porciones cromosómicas de las especies silvestres *A. correntina*/*A. cardenasii* en el subgenoma A, así como de porciones cromosómicas de *A. batizocoi* en el subgenoma B del maní, aquí observada en las RILs, constituye una gran oportunidad para ampliar la diversidad de las variedades comerciales y generar programas de selección con incorporación de genes de especies silvestres en Argentina.

### **Caracterización genotípica de la población interespecífica de RILs con SNPs y mapeo genético de la resistencia al carbón**

La caracterización genotípica de las 103 RILs reveló proporciones equilibradas de marcadores SNP polimórficos para los genomas A y B/K, como se esperaba de la representación de marcadores en la plataforma 48K ‘Axiom\_*Arachis2*’ SNP array (Clevenger *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2017). La diferencia en el número de marcadores especie específicos observados para los progenitores diploides del anfidiplóide puede interpretarse en el contexto del grado de disimilitud que las especies silvestres tienen entre ellas y con los subgenomas del maní cultivado. Esto es, la detección de un número bajo de marcadores especie específicos (99 SNP específicos de *A. correntina* y 98 de *A. cardenasii*) comparados con los observados para *A. batizocoi*, puede explicarse por el hecho de que el genoma A de las especies diploides tienen una alta similitud entre ellas y con el subgenoma A de *A. hypogaea* (Pandey *et al.*, 2017). En contraste, la cantidad diez veces mayor (1139) de marcadores especie específicos para *A. batizocoi* que aquellos detectados para las especies silvestres con genoma A se puede explicar por la menor similitud que éste tiene con el genoma B. El genoma K de *A. batizocoi*, aunque es más similar al genoma B (incluyendo al subgenoma B de *A. hypogaea*) que al genoma A (Leal-Bertioli *et al.*, 2015a), tiene menor similitud de secuencias con el subgenoma B del maní cultivado que lo que tienen las especies de genoma A con el subgenoma A de *A. hypogaea*.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que los genomas B y K recombinan entre sí (Nguepjob *et al.*, 2016), aunque el número promedio de bivalentes observados en los híbridos interespecíficos (Stalker *et al.*, 1991) es menor (7-8) al observado en híbridos entre especies del mismo genoma. En este contexto, aunque la tasa de recombinación entre B-K puede ser menor a la esperada para híbridos interespecíficos BB, la proporción de los marcadores del genoma K específicos detectados en el subgenoma B es mayor que los detectados para las especies silvestres con genoma A. Esto se explica, precisamente por la diferencia en el número de marcadores especie específicos detectados para *A. batizocoi*. Este razonamiento permite explicar el mayor número de alelos específicos de *A. batizocoi* observado en las RILs en comparación con los marcadores introducidos de *A. cardenasii* o *A. correntina*.

Este razonamiento está respaldado también por el hecho que de un total de 3456 marcadores especie específicos para *A. hypogaea*, 1268 marcadores alinearon con el subgenoma A (E-valor  $<10e-20$ ) y 2158 alinearon en el subgenoma B (E-valor  $<10e-20$ ). Esto se interpreta como que una buena parte de los marcadores del subgenoma A (derivado de la especie diploide silvestre *A. duranensis*, genoma A) fueron compartidos con *A. cardenasii* y *A. correntina*, mientras que los detectados en el subgenoma B no fueron compartidos con *A. batizocoi*.

La mayoría de los marcadores SNP fueron heredados según lo esperado para un alopoliploide con segregación disómica, pero otros (2,8%) fueron observados con patrones genotípicos compatibles con recombinación homeóloga y herencia tetrasómica explicables por el carácter segmentario del mismo (Clevenger *et al.*, 2017; Leal-Bertioli *et al.*, 2015b). El porcentaje observado de estos fenómenos en la población interespecífica de RILs es similar al citado para una población de tipo y tamaño similar (Leal-Bertioli *et al.*, 2015b).

Otra cantidad considerable de marcadores (principalmente en los GL A04, A05, A07, B03 y B04) mostraron segregación distorsionada con preferencia al genoma de *A. hypogaea*. Esta segregación distorsionada revela una fuerte selección en contra los alelos del anfiploide. Curiosamente, en este trabajo se identificaron 6 grupos de esos marcadores en cinco cromosomas diferentes, sugiriendo la existencia de regiones de segregación distorsionada (SDR). Las SDR han sido identificadas en cruzamientos interespecíficos o cruzamientos amplios en plantas (Ballén-Taborda *et al.*, 2019; Ting *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012) y se caracterizan por poseer factores genéticos de selección en

contra asociados a competencia gametofítica (Zhang *et al.*, 2013). Este hallazgo es relevante debido a que todos los genes o marcadores estrechamente ligados a un gen que causa distorsión en la segregación y segrega dentro de las SDRs, tenderán también a exhibir segregación distorsionada (Manrique-Carpintero *et al.*, 2016; Zamir y Tadmor, 1986), lo que puede afectar significativamente el éxito en el proceso de mejoramiento genético. En este contexto, es necesario profundizar en la investigación de las poblaciones interespecíficas de *Arachis* para definir mejor la dirección, la tasa de segregación distorsionada y los factores genéticos existentes dentro de las SDR.

En *Arachis*, como en otros sistemas genéticos vegetales, los mecanismos de distorsión de la segregación no son claros, y los marcadores que muestran distorsión en la segregación son usualmente descartados para la construcción de mapas (Han *et al.*, 2018; Shirasawa *et al.*, 2018). Aun así, diversos estudios han mostrado que los marcadores con segregación distorsionada incrementaron la densidad y la cobertura genómica del mapa y permitieron refinar la detección de QTL (Hu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2009). Estos autores mostraron que los marcadores distorsionados pueden ser usados para el mapeo de QTL sin efecto adverso en los resultados y pueden ser beneficiosos si se usan adecuadamente, resultando en la detección de una mayor variabilidad genética en comparación a cuando se analizan solo los marcadores sin distorsión. Además, el uso de marcadores distorsionados en esos estudios, mejoró la detección de QTLs y no tuvieron efectos significativos en la posición o en la detección de QTLs durante el análisis (Zhang *et al.*, 2010). En esta tesis, el agregado de 889 marcadores distorsionados (hasta 4:1) o co-localizados con los marcadores estructurales no cambió el tamaño de los GL o la posición de los marcadores y mejoró significativamente la densidad del mapa. El mapa resultante con 1819 *loci* mapeados abarcando una longitud total de 2531.81 cM está dentro del rango de densidad y cobertura genómica de mapas construidos para otras poblaciones de mapeo de *Arachis* y publicados anteriormente (Ballén-Taborda *et al.*, 2019; Bertioli *et al.*, 2014; Chavarro *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2019).

La posición genética de la mayoría de los SNP fue concordante con las posiciones físicas en las pseudomoléculas de la versión del genoma de referencia de *A. hypogaea* cv Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019) y confirmada por alineamiento de secuencias (BLASTn) luego del mapeo genético. Los GL resultantes fueron asignados a cromosomas individuales, sin posiciones redundantes en GL diferentes, de los subgenomas A y B. La presencia de

marcadores con asignaciones cruzadas a los genomas de referencia (11,5%) es esperable ya que la asignación de un SNP a un genoma particular (A o B) en la plataforma 48K ‘Axiom\_*Arachis2*’ SNP array no indica necesariamente especificidad genómica. Si bien la variante fue detectada en alguna especie con un genoma en particular, la misma variante podría estar representada en individuos distintos a los utilizados para el desarrollo del *array* y que no pertenecen al mismo genoma (Clevenger *et al.*, 2017; Clevenger *et al.*, 2018). La construcción de los GL A02 y B02 representó un desafío ya que se manifestaban inestables cuando el set de datos completo de SNPs se usaba para la construcción de los mismos. El proceso de construcción de los homeólogos 2 se incluyó la selección del grupo de SNPs según su asignación a los cromosomas de *A. duranensis* (Aradu.A02) y *A. ipaënsis* (Araip.B02) (Clevenger *et al.*, 2018). Este abordaje mejoró la distribución y el número de marcadores mapeados. El GL A02/B02 se conservó como parte del mapa, ya que portaba dos de los SNPs asociados significativamente ( $P < 0.01$ ) al carácter resistencia al carbón del maní. Aunque el GL A02/B02 podría ser asignado a los homeólogos del grupo 2, la asignación de genoma no fue posible. Primero porque este fragmento corto no se pudo unir ni al GLA02 ni al GLB02 [aún cuando se usó un P-valor ( $1e^{-4}$  a  $1e^{-6}$ ) para determinar qué marcadores pertenecen al mismo grupo de ligamiento]; segundo, porque sólo uno de los tres SNPs que lo componen, fue mapeado previamente al cromosoma Arahy.12 (Clevenger *et al.*, 2018) y tercero, los otros dos SNPs del GL A02/B02 mostraron alineaciones ambiguas en la secuencia de referencia of *A. hypogaea* cv. Tifrunner (Bertioli *et al.*, 2019) (<https://peanutbase.org>).

Por otra parte, la estrecha asociación observada entre los marcadores de los grupos de ligamiento A03/B03 y A04/B04 puede explicarse por la ocurrencia de recombinación homeóloga, comportándose como regiones genómicas de recombinación tetrasómica (Bertioli *et al.*, 2019).

Los GL del mapa de ligamiento construido para las RILs fueron consistentes con las pseudomoléculas ensambladas de *A. hypogaea* (Bertioli *et al.*, 2019). Solamente se detectó una inversión paracéntrica de una gran porción del cromosoma A05 en coincidencia con lo citado por Bertioli *et al.*, (2016) y Wang *et al.*, (2018). Los marcadores presentaron una distribución uniforme aceptable a lo largo del genoma al ser comparados con sus posiciones físicas en el genoma tetraploide y la cobertura fue adecuada para la identificación de QTLs.

## QTL para resistencia al carbón del maní

El análisis fenotípico de la población interespecífica de RILs evidenció que la resistencia al carbón del maní fue exitosamente introgresada a una línea comercial de maní cultivado a partir de un anfidiplóide derivado del cruzamiento de tres especies silvestres y posterior duplicación cromosómica. En este marco, la arquitectura genética de la resistencia al carbón del maní introgresada desde especies silvestres fue diseccionada en un contexto tetraploide. Las dos regiones genómicas que se detectaron asociadas al control de la resistencia al carbón del maní explicaron una fracción significativa (17,52 % el qSmIA08 y 9.06 % el qSmIA02/B02) de la varianza fenotípica del carácter. Aunque qSmIA02/B02 mostró un PVE menor al 10%, valor que es considerado como límite entre un QTL mayor y uno menor (Collard *et al.*, 2005), no hubo diferencias significativas en la resistencia al carbón del maní cuando qSmIA08 fue AA en el SNP AX-147229403 y qSmIA02/B02 fue BB en el SNP AX-147212854 o *vice versa*. Estos resultados junto con los valores de efecto aditivo detectados para los QTL, evidenciaron que los mismos constituyen la base genética principal en la expresión de la resistencia. El efecto combinado de ambos QTL redujo en un 57% el valor de incidencia de carbón del maní y fueron estables en los tres años de evaluación.

El marcador AX-147229403 fue identificado en homocigosis GG en *A. correntina*, *A. cardenasii* y el anfidiplóide mientras que en heterocigosis GT en *A. batizocoi* y en homocigosis TT en *A. hypogaea*. La variante G del alelo es la que se consideró asociada a la resistencia. Este marcador, fue el más cercano al pico del QTL detectado dentro del intervalo de qSmIA08. El mismo mapeó en el cromosoma A08 y, por ello, se dedujo que fue introgresado de alguna de las especies silvestres de genoma A. Sin embargo, no fue posible atribuirlo a *A. correntina* o *A. cardenasii* ya que el marcador no fue especie específico. Este razonamiento se sustenta en el hecho que es más probable que ocurra recombinación entre el genoma A silvestre y el subgenoma A de *A. hypogaea* y no entre este y el genoma K de *A. batizocoi* (Leal-Bertioli *et al.*, 2015a; Leal-Bertioli *et al.*, 2018).

El marcador AX-147212854, el más cercano al pico del QTL dentro del intervalo de qSmIA02/B02, fue identificado en homocigosis TT en las tres especies silvestres (*A.*

*correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi*) y en homocigosis GG en *A. hypogaea*. La variante alélica T del locus es la que se consideró asociada a la resistencia, aunque no pudo establecerse la fuente de introgresión. Primero porque el alelo del SNP no fue genoma específico, segundo, porque las secuencias flanqueantes del SNP fueron muy similares entre las tres especies silvestres, con alineaciones ambiguas en los genomas A ó K. Finalmente, el SNP fue asignado al genoma B de *A. ipaënsis* en la primera versión de la plataforma de genotipado (Clevenger *et al.*, 2017), pero luego al genoma A de *A. duranensis* en la segunda versión de la plataforma Axiom\_Arachis2' SNP (Clevenger *et al.*, 2018). Además, el qSmIA02/B02 fue mapeado en una región que exhibe patrones de recombinación tetrasómica (Clevenger *et al.*, 2017). Bertoli *et al.*, 2019 demostraron la ocurrencia de intercambios genéticos entre los genomas A y B en las porciones distales de los cromosomas Arahy.02/Arahy.12. Por ello, la recombinación homeóloga detectada en esta región podría incrementar la incertidumbre en la determinación de la fuente de introgresión de la resistencia. Serán necesarios una mayor cantidad de marcadores para definir con certeza la fuente silvestre de la resistencia. Sin embargo, los resultados obtenidos, muestran que la resistencia proviene desde las especies silvestres y no desde *A. hypogaea*.

La precisión en la definición de la posición de los QTLs podría estar mayormente afectada por el tamaño de la población y la heredabilidad del carácter (Charmet, 2000) y menos afectada por el espaciamiento de los marcadores, excepto en el caso en que el mapa tenga un espaciamiento irregular de los mismos. En este estudio, aunque el tamaño de la población fue sub-óptimo, la heredabilidad fue alta ( $H^2 = 95\%$ ). Además, la independencia entre los QTLs detectada en el análisis de haplotipos en la posición de los SNPs, aumentó la confianza de la precisión de la posición de los QTLs detectados.

Aunque sólo se consideraron los QTLs estables en los tres años de evaluación, se detectó una asociación significativa en el GL B09 (9.35 Mbp - 10.97 Mbp) que amerita una consideración especial. En tanto que un bloque de 457 kb en el cromosoma Arahy.19 fue citado como una región asociada a la resistencia al carbón del maní (Massa *et al.*, 2021).

La existencia de fuentes diversas de resistencia es relevante para el desarrollo de variedades con resistencia más durable al carbón, que podría sostenerse ante la presencia de diferentes cepas de *T. frezii* (Rago *et al.*, 2017). En el contexto de este trabajo, la incorporación de segmentos cromosómicos de resistencia al carbón del maní a partir de especies silvestres en líneas compatibles con *A. hypogaea* plantea un escenario de mayor diversidad con respecto a la durabilidad de la resistencia en comparación a instancias con incorporación de resistencia desde una fuente única.

### **Identificación de genes candidatos para la resistencia al carbón del maní**

Las regiones cromosómicas involucradas en la resistencia al carbón son particularmente ricas en QTL asociados a resistencia a diferentes enfermedades. Cerca o solapando el intervalo de qSmIA08 (1,23 Mbp - 6,04 Mbp) se han identificado QTL para resistencia a otras enfermedades de maní como al virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV) y a la viruela temprana (ELS) (Pandey *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2018). Asimismo, dentro del intervalo de qSmIA02/B02 (3,43 - 4,29 Mbp) se detectaron genes de resistencia al virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV), viruela temprana (ELS) y viruela tardía (LLS) (Pandey *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2018) en el genoma B y no se detectaron regiones cercanas o solapando con qSmIA02/B02 (3,43 - 4,29 Mbp) en el genoma A. A pesar del gran interés que presentan estos intervalos, la vinculación de los segmentos cromosómicos introgresados desde las especies silvestres utilizadas en esta tesis a otros caracteres de interés agronómico como los citados debe ser aún investigados.

Los mecanismos de la resistencia al carbón del maní son ampliamente desconocidos. Sin embargo, los genes candidatos presentes en los intervalos de los QTL aquí identificados sugieren algunas vías metabólicas o grupos de genes candidatos a ser investigados. Uno de esos grupos de genes codifican para las proteínas NBS-LRR y TIR-NBS-LRR que actúan a través de una red de vías de señales que inducen una serie de

respuestas de defensa en las plantas, tales como la liberación de grandes cantidades de compuestos reactivos al oxígeno, flujos recíprocos de calcio e iones, reacciones en cascada de cinasas asociadas a mitógenos, inducción de genes vinculados a reacciones de patogénesis y respuesta hipersensible (Belkhadir *et al.*, 2004; Hammond-Kosack y Parker, 2003, Pedley y Martin, 2005). Otro de los grupos, corresponden a las proteínas NAC que constituyen una gran familia de genes (Ren *et al.*, 2000) que codifican factores de transcripción con muy diversas funciones, pero algunas están relacionadas a respuestas de defensa a infección de patógenos en plantas (Oh *et al.*, 2005). Asimismo, el sitio de unión a nucleótido del dominio de ATPasa NB-ARC se ha propuesto como regulador de la actividad de proteínas R (Van Ooijen *et al.*, 2008). Por otra parte, los genes de la familia de proteínas MLO participan en las vías metabólicas que median en la defensa inespecífica en una amplia variedad de taxones de eudicotiledóneas (Acevedo-García *et al.*, 2014; Consonni *et al.*, 2006). Es posible que un solo gen por QTL confiera la resistencia, sin embargo, Michelmore, (1998) propuso que los genes que controlan la resistencia en plantas se encuentran frecuentemente agrupados en el genoma y la mayoría de esos genes codifican sitios de unión a nucleótidos (NBS, por sus siglas en inglés) y dominios repetitivos ricos en leucina (LRR, por sus siglas en inglés). En maní y en otros cultivos, se han citado puntos calientes de resistencia (*hotspots*) (grupos de genes R) para resistencia a múltiples enfermedades (Massa *et al.*, 2015; Bertioli *et al.*, 2016, Nagy *et al.*, 2010).

El hecho de que los transcriptos que resultaron de los modelos de genes analizados en los intervalos de qSmIA08 y qSmIA02/B02 se expresan en tejidos reproductivos (excepto dos) de *A. hypogaea* cv Tifrunner, y principalmente en el período fenológico entre los estadios de ginóforo aéreo y el del clavado del ginóforo siguiendo los estados descritos por Clevenger *et al.*, (2016), es muy relevante para la identificación de los genes que confieren resistencia al carbón del maní. Esto es así, dado que se demostró que la infección de *T. frezii* se inicia durante la etapa de clavado del cultivo (Marraro Acuña *et al.*, 2013), es decir en el momento en que el ginóforo penetra el suelo. La temporalidad de expresión citada sustenta la hipótesis de que los genes encontrados en los intervalos de los QTLs mayores son los principales candidatos a estar involucrados en la resistencia al carbón del maní.

## CONCLUSIÓN



La utilización de marcadores SSR y SNP permitió confirmar la naturaleza trihíbrida del anfidiploide obtenido por el cruzamiento de las especies silvestres *A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi*. El desarrollo de ese material y la identificación de sus componentes genómicos son pasos claves en la obtención de material de pre-mejoramiento para obtener variedades resistentes al carbón del maní, así como para otros caracteres de interés agronómico.

Con el genotipificado con marcadores SNPs se construyó un mapa genético para la población interespecífica de RILs que permitió la disección genética del carácter resistencia al carbón del maní. Los dos QTL introgresados desde especies diploides de *Arachis* representan diferentes fuentes de resistencia, siendo esto muy importante para el desarrollo de variedades con resistencia durable.

Se identificaron 44 modelos de genes en los intervalos de los QTL con alta densidad de transcripción en los primeros estadios de la formación del clavo, cuando la infección de *T. frezii* ocurre. Esto constituye un punto de partida clave para investigar los mecanismos involucrados en la resistencia al carbón del maní.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo -García, J., Kusch, S., and Panstruga, R. (2014). Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist*, 204(2): 273-281.
- Agarwal, G., Clevenger, J., Pandey, M. K., Wang, H., Shasidhar, Y., Chu, Y., and Huang, G. (2018). High - density genetic map using whole - genome resequencing for fine mapping and candidate gene discovery for disease resistance in peanut. *Plant biotechnology journal*, 16(11): 1954-1967.
- Arias, R.S., V.S. Sobolev, A.N. Massa, V.A. Orner, T.E. Walk, L.L. Ballard, S.A. *et al.* 2018. New tools to screen wild peanut species for aflatoxin accumulation and genetic fingerprinting. *BMC Plant Biology*. 18: 1–13. doi: 10.1186/s12870-018-1355-9.
- Ballén-Taborda, C., Chu, Y., Ozias-Akins, P., Timper, P., Holbrook, C. C., Jackson, S. A., ... and Leal-Bertioli, S. C. (2019). A new source of root-knot nematode resistance from *Arachis stenosperma* incorporated into allotetraploid peanut (*Arachis hypogaea*). *Scientific reports*, 9(1): 1-13.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current opinion in plant biology*, 7(4): 391-399.
- Bertioli, D. J., Ozias-Akins, P., Chu, Y., Dantas, K. M., Santos, S. P., Gouvea, E., ... and Moretzsohn, M. C. (2014). The use of SNP markers for linkage mapping in diploid and tetraploid peanuts. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(1): 89-96.
- Bertioli, D.J., S.B. Cannon, L. Froenicke, G. Huang, A.D. Farmer, E.K.S. Cannon, *et al.* 2016. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nat. Genet.* 48: 438–446. doi: 10.1038/ng.3517.
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Clevenger, J., Dudchenko, O., Gao, D., Seijo, G., and Samoluk, S. S. (2019). The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. *Nature genetics*, 51(5): 877-884.
- Bressano, M., Massa, A. N., Arias, R. S., de Blas, F., Oddino, C., Faustinelli, P. C., and Lamb, M. C. (2019). Introgression of peanut smut resistance from landraces to elite peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L.). *PloS one*, 14(2): e0211920.
- Brownstein, M.J., J.D. Carpten, and J.R. Smith. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by tag DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004–1010. doi: 10.2144/96206st01
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7): 889-890.
- Broman, K. W., and Sen, S. (2009). *A Guide to QTL Mapping with R/qtl* (Vol. 46). New York: Springer.
- Broman, K. W., Gatti, D. M., Simecek, P., Furlotte, N. A., Prins, P., Sen, S., ... and Churchill, G. A. (2019). R/qtl2: software for mapping quantitative trait loci with high-dimensional data and multiparent populations. *Genetics*, 211(2): 495-502.
- Burow, M.D., C.E. Simpson, J.L. Starr, and A.H. Paterson. 2001. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics* 159: 823–837. doi: dx.doi.org/10.1245/s10434-013-3474-8.
- Carranza, J., and J. Lindquist. 1962. *Thecaphora frezii*, parasitic of the *Arachis* sp. (In Spanish). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 10: 11–18.

- Charmet, G. (2000). Power and accuracy of QTL detection: simulation studies of one-QTL models. *Agronomie*, 20(3): 309-323.
- Chavarro, C., Chu, Y., Holbrook, C., Isleib, T., Bertioli, D., Hovav, R., and Ozias-Akins, P. (2020). Pod and seed trait QTL identification to assist breeding for peanut market preferences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*.
- Chen, C., Umez, K., and Kolodner, R. D. (1998). Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Molecular cell*, 2(1): 9-22.
- Chen, X., Lu, Q., Liu, H., Zhang, J., Hong, Y., Lan, H., and Pandey, M. K. (2019). Sequencing of cultivated peanut, *Arachis hypogaea*, yields insights into genome evolution and oil improvement. *Molecular plant*, 12(7): 920-934.
- Cignetti, M. I., Baldessari, J. J., Marraro Acuña, F., and Mazzini, P. H. (2010). Evaluación multianual de cultivares de maní frente al carbón *Thecaphora frezzi*. Jornada Nacional de Maní. 25. 2010 09 16, 16 de septiembre de 2010. General Cabrera, Córdoba. AR.
- Clevenger, J. P., Korani, W., Ozias-Akins, P., and Jackson, S. (2018). Haplotype-based genotyping in polyploids. *Frontiers in plant science*, 9, 564.
- Clevenger, J., Chu, Y., Scheffler, B., and Ozias-Akins, P. (2016). A developmental transcriptome map for allotetraploid *Arachis hypogaea*. *Frontiers in plant science*, 7, 1446.
- Clevenger, J., Chu, Y., Chavarro, C., Agarwal, G., Bertioli, D. J., Leal-Bertioli, S. C., ... and Hovav, R. (2017). Genome-wide SNP genotyping resolves signatures of selection and tetrasomic recombination in peanut. *Molecular plant*, 10(2): 309-322.
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1): 169-196.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., ... and Somerville, S. C. (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature genetics*, 38(6): 716-720.
- Dodia, S. M., Joshi, B., Gangurde, S. S., Thirumalaisamy, P. P., Mishra, G. P., Narandrakumar, D., ... and Chitikineni, A. (2019). Genotyping-by-sequencing based genetic mapping reveals large number of epistatic interactions for stem rot resistance in groundnut. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(4): 1001-1016.
- Doyle, J., and E.E. Dickson. 1987. DNA isolation from small amounts of plant tissue. *Phytochemical Bulletin*. 57: 13–15. doi: 10.2307/4119796.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, and Quattro J.M.. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491. doi: 10.1007/s00424-009-0730-7.
- Fávero, A. P., Nass, L. L., Cargnin, A., and Leonardecz Neto, E. (2005). Rooting performance from leaf petioles of accessions and hybrids of wild *Arachis* species. *Scientia Agricola*, 62(1): 62-68.
- Hammond-Kosack, K. E., and Parker, J. E. (2003). Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current opinion in biotechnology*, 14(2): 177-193.
- Haro, R. J., Baldessari, J., and Otegui, M. E. (2013). Genetic improvement of peanut in Argentina between 1948 and 2004: Seed yield and its components. *Field Crops Research*, 149, 76-83.

- Hu, X. H., Zhang, S. Z., Miao, H. R., Cui, F. G., Shen, Y., Yang, W. Q., ... and Chen, J. (2018). High-density genetic map construction and identification of QTLs controlling oleic and linoleic acid in peanut using SLAF-seq and SSRs. *Scientific reports*, 8(1): 1-10.
- Leal-Bertioli, S. C., Godoy, I. J., Santos, J. F., Doyle, J. J., Guimarães, P. M., Abernathy, B. L., and Bertioli, D. J. (2018). Segmental allopolyploidy in action: increasing diversity through polyploid hybridization and homoeologous recombination. *American journal of botany*, 105(6): 1053-1066.
- Leal-Bertioli, S.C.M., S.P. Santos, K.M. Dantas, P.W. Inglis, S. Nielen, A.C.G. Araújo, *et al.* 2015. *Arachis batizocoi*: A study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*. 115: 237–249. doi: 10.1093/aob/mcu237.
- Leal-Bertioli, S., Shirasawa, K., Abernathy, B., Moretzsohn, M., Chavarro, C., Clevenger, J., ... and Bertioli, D. (2015). Tetrasomic recombination is surprisingly frequent in allotetraploid *Arachis*. *Genetics*, 199(4): 1093-1105.
- Leal-Bertioli, S.C.M., A.C. José, D.M.T. Alves-Freitas, M.C. Moretzsohn, P.M. Guimarães, S. Nielen *et al.* 2009. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biol.* 9: 112. doi: 10.1186/1471-2229-9-112.
- Liu, B., J.M. Vega, G. Segal, S. Abbo, H. Rodova, M. Feldman, and M. Rodova. 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome* 41: 272–277. doi: 10.1139/gen-41-4-535.
- Liu, N., Chen, H., Huai, D., Xia, F., Huang, L., Chen, W., ... and Chen, Y. (2019). Four QTL clusters containing major and stable QTLs for saturated fatty acid contents in a dense genetic map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding*, 39(2): 1-14.
- Massa, A. N., Bressano, M., Soave, J. H., Buteler, M. I., Seijo, G., Sobolev, V. S., ... & Arias, R. S. (2021). Genotyping tools and resources to assess peanut germplasm: smut-resistant landraces as a case study. *PeerJ*, 9, e10581.
- Massa, A. N., Manrique-Carpintero, N. C., Coombs, J. J., Zarka, D. G., Boone, A. E., Kirk, W. W., ... & Douches, D. S. (2015). Genetic linkage mapping of economically important traits in cultivated tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(11): 2357-2364.
- Marraro Acuña, F., M.T. Cosa, and A.P. Wiemer. 2013. Peanut smut: histopathology, incidence and severity. (In Spanish). In XXVIII Jornada Nacional del Maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina. 19 September. p. 26–27.
- Michelmore, R. W., & Meyers, B. C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome research*, 8(11): 1113-1130.
- Moretzsohn, M.C., L. Leoi, K. Proite, P.M. Guimarães, S.C.M. Leal-Bertioli, M.A. Gimenes, W.S. Martins, J.F.M. Valls, D. Grattapaglia, and D.J. Bertioli. 2005. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (*Fabaceae*). *Theoretical and Applied Genetics*. 111: 1060–1071. doi: 10.1007/s00122-005-0028-x.
- Nagy, E. D., Chu, Y., Guo, Y., Khanal, S., Tang, S., Li, Y., ... & Knapp, S. J. (2010). Recombination is suppressed in an alien introgression in peanut harboring Rma, a dominant root-knot nematode resistance gene. *Molecular Breeding*, 26(2): 357-370.
- Nguepjob, J. R., Tossim, H. A., Bell, J. M., Rami, J. F., Sharma, S., Courtois, B. and Fonceka, D. (2016). Evidence of genomic exchanges between homeologous

- chromosomes in a cross of peanut with newly synthesized allotetraploid hybrids. *Frontiers in plant science*, 7, 1635.
- Oddino, C.M., J.A. Soave, S.J. Soave, M.I. Buteler, A. Moresi, F.J. de Blas, M. Bressano, C. Bianco, and D. Torre. 2017. Sources of smut resistance in peanut wild species and Bolivian landraces. In *Advances in Arachis through genomics and biotechnology*. Córdoba, Argentina. 14 – 17 March. p. 8. <https://peanutbase.org/files/AAGB-2017-Abstracts.docx>
- Oh, S. K., Lee, S., Yu, S. H., and Choi, D. (2005). Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta*, 222(5): 876-887.
- Ouellette, L. A., Reid, R. W., Blanchard, S. G., and Brouwer, C. R. (2018). LinkageMapView—rendering high-resolution linkage and QTL maps. *Bioinformatics*, 34(2): 306-307.
- Pasupuleti, J., Pandey, M. K., Manohar, S. S., Variath, M. T., Nallathambi, P., Nadaf, H. L., ... and Varshney, R. K. (2016). Foliar fungal disease-resistant introgression lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) record higher pod and haulm yield in multilocation testing. *Plant Breeding*, 135(3): 355-366.
- Pandey, M. K., Agarwal, G., Kale, S. M., Clevenger, J., Nayak, S. N., Sriswathi, M., and Vishwakarma, M. K. (2017). Development and evaluation of a high density genotyping ‘Axiom\_ *Arachis*’ array with 58 K SNPs for accelerating genetics and breeding in groundnut. *Scientific Reports*, 7(1): 1-10.
- Pedley, K. F., and Martin, G. B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 8(5): 541-547.
- Proite, K., S.C.M. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, M.C. Moretzsohn, F.R. da Silva, N.F. Martins *et al.* 2007. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology*. 7: 7. doi: 10.1186/1471-2229-7-7.
- Rago, A.M., L.I. Cazón, J.A. Paredes, J. Edwards Molina, C. Conforto, E. Bisonard *et al.* 2017. Peanut Smut: from an emerging disease to an actual threat to Argentine peanut production. *Plant Disease*. 101: 400–408. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1248-FE.
- Ré, F. 2019. Argentina. En: *AgroVoz*, Córdoba, Argentina, Octubre 05, <http://agrovoz.lavoz.com.ar/agricultura/primer-maní-resistente-al-carbon-ya-tiene-aval-oficial>.
- Ren, T., Qu, F., and Morris, T. J. (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant Cell*, 12(10): 1917-1925.
- Rezvoy, C., Charif, D., Guéguen, L., and Marais, G. A. (2007). MareyMap: an R-based tool with graphical interface for estimating recombination rates. *Bioinformatics*, 23(16): 2188-2189.
- Ritchie, D. M., and Thompson, K. (1978). The UNIX time-sharing system. *Bell System Technical Journal*, 57(6): 1905-1929.
- Shirasawa, K., Bhat, R. S., Khedikar, Y. P., Sujay, V., Kolekar, R. M., Yeri, S. B., ... and Varshney, R. K. (2018). Sequencing analysis of genetic loci for resistance for late leaf spot and rust in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 1727.
- Smith, B. W. (1950). *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal of Botany*, 802-815.

- Soave, J.A., Bianco C., Burgoa R., Montañó R., Rago A.M., L.I. Cazón 2014. Primera detección de carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en Bolivia. 3° Congreso Argentino de Fitopatología. San Miguel de Tucumán, Argentina. p. 211.
- Song, K., P. Lu, K. Tang, and T.C. Osborn. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. In: Allard, R.W., editor, Proc. Natl. Acad. Sc. USA. Bodega Bay, CA, USA. 12May. Evolution. 92: 7719–7723.
- Stalker, H.T. 2017. Utilizing wild species for peanut improvement. Crop Science. 57: 1102–1120. doi: 10.2135/cropsci2016.09.0824.
- Stalker, H. T., Tallury, S. P., Seijo, G. R., and Leal-Bertioli, S. C. (2016). Biology, speciation, and utilization of peanut species. In Peanuts (pp. 27-66). AOCS Press.
- Stalker, H. T. (1991). A new species in section *Arachis* of peanuts with ad genome. American Journal of Botany, 78(5): 630-637.
- Taylor, J., and Butler, D. (2017). R package ASMap: efficient genetic linkage map construction and diagnosis. arXiv preprint arXiv:1705.06916.
- Ting, N. C., Jansen, J., Mayes, S., Massawe, F., Sambanthamurthi, R., Ooi, L. C. L., and Ithnin, M. (2014). High density SNP and SSR-based genetic maps of two independent oil palm hybrids. BMC genomics, 15(1): 309.
- Van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, M. M., Albrecht, M., Cornelissen, B. J., and Takken, F. L. (2008). Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. Journal of experimental botany, 59(6): 1383-1397.
- Varshney, R. K., Pandey, M. K., Janila, P., Nigam, S. N., Sudini, H., Gowda, M. V. C., ... and Nagesh, P. (2014). Marker-assisted introgression of a QTL region to improve rust resistance in three elite and popular varieties of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Theoretical and Applied Genetics, 127(8): 1771-1781.
- Wang, G., He, Q. Q., Xu, Z. K., and Song, R. T. (2012). High segregation distortion in maize B73 x teosinte crosses. Genetics and Molecular Research, 11(1): 693-706.
- Xu, S., and Hu, Z. (2009). Mapping quantitative trait loci using distorted markers. International journal of plant genomics, 2009.
- Zamir, D., and Tadmor, Y. (1986). Unequal segregation of nuclear genes in plants. Botanical gazette, 147(3): 355-358.
- Zhang, Y., Wang, L., Xin, H., Li, D., Ma, C., Ding, X., and Zhang, X. (2013). Construction of a high-density genetic map for sesame based on large scale marker development by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. BMC plant biology, 13(1): 1-12.
- Zhang, L., Wang, S., Li, H., Deng, Q., Zheng, A., Li, S., and Wang, J. (2010). Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F<sub>2</sub> populations. Theoretical and Applied Genetics, 121(6): 1071-1082.
- Zhuang, W., Chen, H., Yang, M., Wang, J., Pandey, M. K., Zhang, C., and Garg, V. (2019). The genome of cultivated peanut provides insight into legume karyotypes, polyploid evolution and crop domestication. Nature genetics, 51(5): 865-876.

## CAPITULO VI

### CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis se usaron generaciones avanzadas (F<sub>7.9</sub>) de la población interespecífica de RILs, para identificar las regiones genómicas que confieren resistencia al carbón en un contexto tetraploide. Al mismo tiempo, se caracterizó a la población utilizando diversos caracteres morfológicos y la composición química proximal en especial con referencia a la composición de ácidos grasos. Asimismo, se realizó la caracterización genómica de las RILs con las cuales se construyó un mapa genético con 1819 marcadores anclados y se identificaron dos regiones genómicas que permitieron disectar la estructura genética de la resistencia al carbón del maní. Esta información constituye la base de conocimiento para el futuro desarrollo de marcadores moleculares para asistir la selección de materiales resistentes a *T. frezii* en los programas de mejoramiento de maní en un futuro inmediato. A más largo plazo, permitirá incorporar estos materiales a planes de mejoramiento para otros caracteres como alto porcentaje de grasas, proteínas, cenizas o resistencia a otros patógenos.

#### **Caracterización fenotípica del material vegetal.**

La naturaleza genética de la resistencia al carbón era desconocida, hasta el momento. La identificación de resistencia en las especies silvestres de genomas A y K y su introgresión a las líneas compatibles con el maní cultivado analizado en el capítulo III muestran que esta resistencia es altamente heredable y el patrón de herencia sugiere que podría estar controlada por pocas regiones genómicas.

De la caracterización morfológica, se obtuvieron resultados que muestran una gran variabilidad intrapoblacional y se identificó un set de 19 caracteres con la máxima variabilidad entre genotipos reduciendo los 39 caracteres medidos inicialmente para la caracterización morfológica. La mayor parte de los caracteres analizados muestra segregación transgresiva con respecto a los parentales de las RILs y de las especies silvestres con que se desarrolló el anfidiplóide. Esta segregación probablemente esté relacionada a la acumulación de alelos provenientes de diferentes fuentes para una misma característica y con la poliploidización.

Se detectaron algunos caracteres con correlaciones significativas con la incidencia al carbón del maní, aunque la significancia biológica de las mismas debe aún estudiarse con más profundidad.

Se identificaron 11 RILs resistentes (con 0% a 0.07% de incidencia de carbón) que pertenecen al grupo exomorfológico de *A. hypogaea*, proporcionando un material de premejoramiento altamente compatible con la especie cultivada y que llevan segmentos introgresados que gobiernan la resistencia al carbón del maní.

### **Caracterización de los parámetros de calidad química de la población interespecífica de RILs**

En este estudio se detecta que los valores promedio de los parámetros químicos medidos en las RILs fueron concordantes con los parámetros previamente publicados para *A. hypogaea* y especies diploides silvestres del género. Sin embargo, la mayoría de los caracteres presentó una elevada variabilidad y segregación transgresiva. Esta segregación se podría también atribuir a la acumulación de genes de acción complementaria y efecto aditivo y al proceso de poliploidización.

Mediante la determinación de la composición de ácidos grasos se identificaron 97 RILs con una elevada estabilidad oxidativa dada por los valores de O/L y iodo. De este grupo, 16 RILs también son resistentes al carbón del maní.

La variabilidad observada en los resultados de este estudio, sugiere que el uso de un anfidiplóide sintético, contribuye de forma significativa en la ampliación de la variabilidad genética disponible para caracteres nutricionales del grano, entre ellas cantidad de proteínas, fibra y cenizas, para ser utilizada en planes de mejoramiento de nuevas variedades de maní.

### **Caracterización genotípica de las variantes del gen *AhFAD* en la población interespecífica de RILs**

La segregación molecular de los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B* observada en la población, es concordante con el modelo de control de herencia de dos *loci* con dos alelos con dominancia completa.



Si bien, la técnica de detección de las variantes alélicas del gen *AhFAD2* presentó dificultades para la detección de genotipos recombinantes, la misma fue efectiva en la determinación de los genotipos homocigota doble mutantes (R15 y R66), que son los genotipos que se utilizan en los planes de mejoramiento del nivel de ácido oleico.

Los valores promedio de ácido oleico y linoléico calculados para cada clase genotípica, (doble homocigota *wild type*, doble homocigota mutante, doble mutante no doble homocigotas, simple mutante para sustitución homocigota o heterocigota y simple mutante para inserción homocigota o heterocigota) confirman que la determinación de genotipos probables en la población interespecífica de RILs para los genes *AhFAD2A* y *AhFAD2B* son en gran medida los responsables de la variación fenotípica del carácter AO.

### **Caracterización genotípica del material vegetal mediante marcadores moleculares SSRs y SNPs.**

El análisis general de los marcadores SSR y SNP demostró que las tres especies silvestres contribuyeron a la constitución del genoma del anfidiplóide, confirmando su naturaleza trihíbrida.

### **Construcción de un mapa genético para la población interespecífica de RILs**

La caracterización genotípica con la plataforma 48K Axiom\_*Arachis2* SNP de las 103 RILs y sus líneas parentales permitió construir el primer mapa experimental desarrollado en Argentina en *Arachis* con 1819 SNP asignados a 21 GL consistentes con las pseudomoléculas ensambladas de *A. hypogaea* (Bertioli *et al.*, 2019).

### **Identificación regiones genómicas asociadas al carbón mediante el análisis de QTLs**

El análisis de QTL realizado a partir de los datos fenotípicos obtenidos en tres años de evaluación y la construcción del mapa genético permitió detectar dos regiones genómicas introgresadas desde especies silvestres del género *Arachis* en un contexto tetraploide. Los QTL identificados, fueron introgresados de las especies silvestres utilizadas en el

cruzamiento para obtener el anfídiploide (*A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi*). En este sentido, la población interespecífica de RILs, constituye un material ideal para introgresar resistencia durable al carbón en programas de mejoramiento de maní.

### **Exploración de los intervalos genómicos asociados para identificar genes candidatos que gobiernen la resistencia al carbón del maní**

Las regiones genómicas en donde se ubican los QTL son ricas en genes que codifican proteínas que participan en procesos de defensa de las plantas.

El hecho de que la mayoría de los genes identificados se expresen en estadios tempranos del desarrollo del ginóforo constituye un punto de partida sumamente prometedor para investigaciones futuras que persigan la identificación fehaciente de los genes que confieren la resistencia al carbón del maní. De esta manera comprender los procesos fisiológicos y metabólicos involucrados en la resistencia a *T. frezii*.

La detección de variabilidad genética en la población de RILs y la posibilidad de su aplicación en el mejoramiento, puesta de manifiesto en este trabajo de tesis, permite concluir que esta variabilidad se debe a la diversidad genética que presentan las especies silvestres del género *Arachis* y que es plausible de ser introgresada en materiales tetraploides. Esta diversidad se encuentra hoy amenazada en las áreas naturales de dispersión de las especies del género y el conocimiento generado con este tipo de estudios puede ser utilizado como fundamentos para la acción estatal y social de la conservación de dichas áreas. Por otro lado, la articulación del conocimiento que generan las instituciones dedicadas a la recolección y conservación de especies silvestres en los bancos de germoplasma es una necesidad imperativa, ya que no es posible acceder a las fuentes de resistencia o de mejora de caracteres agronómicos y de adaptación mediante esfuerzos individuales. La información vertida en esta tesis fue posible gracias a esa articulación institucional público-privada y presenta el primer reporte de una población interespecífica del género *Arachis* en Argentina, cuyos individuos han sido caracterizados para su utilización en cruzamientos listos para ingresar a programas de mejoramiento de variedades de maní para caracteres cuantitativos de calidad química y de resistencia al carbón del maní.

## ANEXOS

**Anexo 4.1** Composición química proximal de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: *A. hypogaea* y anfídiploide y las especies silvestres que le dieron origen al anfídiploide. Valores composicionales en porcentaje de cenizas, fibras, grasas, azúcares totales y proteínas.

Genotipo	Cenizas	Fibra	Grasa	Azúcares Totales	Proteína
17304-7-B	2,31	11,38	53,28	4,44	28
<i>A. batizocoi</i>	2,76	9,29	51,33	3,6	33,06
<i>A. cardenasii</i>	3,24	7,68	53,61	2,97	32,54
<i>A. correntina</i>	3,05	9,15	48,43	3,54	35,86
JS1806	2,46	11,12	48,88	4,31	33,28
R01	2,24	11,99	48,7	3,14	33,9
R02	2,88	11,69	50,64	3,83	31,06
R03	2,65	11,24	51,32	3,68	27,9
R04	2,54	10,17	52,93	5,23	26,82
R05	2,45	11,07	50,08	4,81	25,73
R06	2,43	10,82	52,73	4,23	29,83
R07	2,45	10,64	52,78	4,83	25,16
R08	2,5	10,61	53,91	4,81	28,31
R09	2,52	11,79	48,8	3,75	33,32
R10	2,38	11,58	53,47	3,37	29,24
R11	2,98	11,27	51,43	3,84	30,36
R12	2,87	10,82	48,8	4,31	33,25
R13	2,59	11,5	48,21	2,92	34,64
R14	2,62	10,81	52,46	4,68	26,86
R15	3,07	11,67	50,89	3,56	30,85
R16	2,4	11,38	49,87	3,44	32,9
R17	2,47	11,21	52,39	4,21	23,3
R18	2,96	11,22	50,61	3,77	31,45
R19	2,48	11,46	50,34	3,75	32,01
R20	2,67	10,82	53,31	5,32	26,61
R21	2,13	11,32	49,95	3,75	32,82
R22	2,34	11,01	52,54	3,83	30,27

R23	2,57	11,64	49,44	3,18	33,16
R24	3,13	11,47	45,5	4,4	35,55
R25	2,91	11,46	49,52	3,86	32,29
R26	3,14	11,11	51,8	4,02	30,51
R27	2,39	10,67	51,22	5,37	26,45
R28	2,95	11,67	50,15	3,74	31,44
R29	2,89	10,74	53,54	5,09	27,7
R30	2,68	11,59	46,92	3,69	34,98
R31	2,87	10,79	49,51	4,4	32,43
R32	2,23	11,37	50,85	3,9	31,62
R33	3,01	11,23	50,99	5,58	29,38
R34	2,56	11,09	50,22	4,91	30,1
R36	2,4	11,89	50,03	3,06	32,62
R37	2,67	11,02	51,66	4,66	28,48
R38	2,62	10,99	48,99	4,71	28,97
R39	2,62	10,68	50,72	5,17	27,74
R40	2,07	11,12	49,99	4,32	31,77
R41	2,5	10,04	52,63	5,29	27,6
R42	2,44	11,18	53,34	3,88	28,55
R43	2,64	11,26	47,42	3,91	34,67
R44	2,55	10,99	50,16	3,92	32,39
R45	2,43	11,12	51,57	3,83	31,17
R46	2,39	10,99	51,03	5,58	26,03
R47	2,66	10,96	53,13	4,22	26,24
R47A	2,16	10,62	55,59	5,27	22,86
R48	2,5	11,43	49,28	3,44	33,26
R49	2,32	11,47	52,62	4,16	29,11
R50	2,85	11,27	48,93	4,39	32,63
R50A	2,33	11,53	49,4	3,74	32,98
R50B	2,63	11,77	47,05	4,1	34,43
R51	2,47	11,45	51,22	4,43	30,4
R52	2,55	10,79	51,62	5,4	27,39
R52A	2,3	10,96	51,85	4,26	30,66
R53	2,23	11,29	48,3	3,82	34,75
R54	2,28	10,83	52,23	4,39	30,24

R55	2,19	11,14	53,34	4,54	27,54
R56	2,38	11,34	50,2	4,02	32,05
R56A	2,45	11,27	47,98	3,77	34,55
R58	2,41	11,39	50,82	4,76	28,52
R59	2,49	10,82	52,72	5,38	28
R60	2,82	10,85	50,08	5	31,21
R61	2,38	11,23	50,18	3,93	26,74
R62	2,12	10,42	55,09	4,81	26,05
R63	2,24	10,57	53,85	5	28,27
R64	2,34	10,91	50,64	4,19	31,92
R64A	2,62	10,99	48,99	4,42	32,95
R65	2,54	11,2	47,59	3,38	35,29
R66	2,93	12,07	49,82	3,1	32,18
R67	2,61	10,8	52,79	4,42	27,9
R69	2,95	10,7	52,87	5,27	28,19
R71	2,17	11,15	47,23	4,72	34,83
R72	2,15	10,95	53,1	4,53	29,25
R72A	2,22	10,7	53,1	5,04	28,9
R73	2,94	11,33	49,12	4,02	32,61
R73A	2,3	11,65	49,14	3,08	33,67
R74	2,16	11,62	47,75	3,61	34,91
R75	2,37	12	50,01	3,56	31,94
R76	2,55	11,21	49,69	3,9	32,61
R77	2,41	11,15	50,1	4,54	25,71
R78	2,28	11,29	53,75	5,85	20,82
R78A	2,04	10,99	51,2	5,57	24,97
R79	2,44	10,78	49,62	4,21	32,96
R80	2,24	11,37	51,08	4,41	30,93
R81	2,59	11,33	48,15	4,08	33,83
R82	2,8	10,71	53,81	4,74	27,98
R83	2,84	10,84	56,48	4,38	25,41
R84	2,22	11,28	52,58	4,6	27,67
R87	2,41	11,1	53,95	4,43	27,29
R88	2,09	11,22	50,65	3,78	32,33
R89	2,58	11,28	52,87	3,59	29,42

R91	2	11,11	53,99	4,63	28,44
R92	2,46	10,5	52,7	5,12	27,27
R93	2,25	11,29	50,61	3,77	32,45
R94	2,67	11,32	51,66	4,22	30,19
R94B	2,41	10,86	49,12	4,86	23,51
R95	2,36	10,67	51,64	4,86	30,41
R95A	2,4	10,63	52,95	4,72	29,29
R96	2,59	11,23	53,18	4,42	28,48
R98	2,49	11,02	50,22	3,78	29,93
R98A	2,35	10,94	50,67	5,42	21,96

**Anexo 4.2** perfil de ácidos grasos de ésteres metílicos de una población interespecífica de 103 RILs, los progenitores: *A. hypogaea* y anfidiplóide y las especies silvestres que dieron origen al anfidiplóide. El contenido de palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3), araquídico (20:0), eicosenoico (20:1), behénico (22:0), erúcico (22:1), lignocérico (24:0) se expresa en porcentaje. % SFA: porcentaje de ácidos grasos saturados; % MUFA: porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados; % PUFA: porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados; O/L: relación oleico/linolénico; S/I: ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados y V.I.: valor de iodo.

Genotipo	Palmítico(16:0)	Esteárico(18:0)	Oleico(18:1)	linoleico(18:2)	Linolénico(18:3)	Araquídico(20:0)	Eicosenoico(20:1)	Behénico(22:0)	Erúcico(22:1)	Lignocérico(24:0)	O/L	V.I.
17304-7-B	4,89	1,42	84,2	3,03	0,03	1,02	1,97	2,16	0,05	1,22	27,79	79,22
<i>A. batizocoi</i>	9,69	2,88	41,49	34,53	0,09	1,71	1,39	6,17	0,05	1,99	1,20	96,59
<i>A. cardenasii</i>	10,75	2,03	45,09	35,99	0,13	1,08	1,01	2,6	0,1	1,23	1,25	101,91
<i>A. correntina</i>	8,89	2,04	40,07	42,48	0,1	1,24	1,1	2,97	0	1,12	0,94	108,91
JS1806	9,7	1,52	37,27	43,17	0,15	0,96	1,89	3,38	0,13	1,84	0,86	108,32
R01	9,32	1,91	47,63	34,21	0,05	1,18	1,27	2,9	0,04	1,5	1,39	101,22
R02	8,48	1,63	50,1	31,55	0,04	1,06	1,59	3,78	0,07	1,69	1,59	98,99
R03	6,34	1,2	81,46	4,48	0,04	0,83	1,91	2,24	0,03	1,46	18,18	79,32
R04	10,49	1,44	50,83	30,76	0,05	1,19	1,24	2,61	0,04	1,35	1,65	97,97
R05	4,67	0,95	83,18	3,81	0,06	0,75	2,53	2,17	0,1	1,79	21,83	80,13

R06	11,17	2,3	35,9	45,83	0,04	1,21	1,07	1,11	0,01	1,36	0,78	111,10
R07	10,09	1,74	39,2	40,35	0,06	1,13	1,56	3,7	0,2	1,98	0,97	104,83
R08	8,54	2,36	49,71	33,07	0,04	1,18	1,19	2,58	0,01	1,3	1,50	100,97
R09	9,67	2,21	52,17	29,86	0,05	1,13	1,17	2,32	0,04	1,38	1,75	97,51
R10	8,94	0,58	51,86	30,52	0,06	1,22	1,73	3,31	0,1	1,7	1,70	98,83
R11	6,54	3,13	76,08	4,27	0,04	1,76	1,34	4,38	0,06	2,4	17,82	73,88
R12	10,61	1,67	35,31	43,31	0,06	1,37	1,51	4,15	0,04	1,97	0,82	106,57
R13	10,12	1,94	49,98	31,38	0,03	1,12	1,18	2,94	0	1,3	1,59	98,27
R14	9,72	2,13	53,37	28,89	0,06	1,21	0,96	2,51	0	1,15	1,85	96,70
R15	5,42	0,24	81,12	5,7	0,06	1,12	2,06	2,47	0,05	1,75	14,23	81,26
R16	9,65	2,3	53,68	26,91	0,04	1,33	1,36	3,28	0,04	1,4	1,99	93,85
R17	4,82	1,12	83,01	4,42	0,04	0,68	2,25	2,06	0,05	1,54	18,78	80,82
R18	10,43	2,08	35,35	44,6	0,04	1,38	1,15	3,44	0	1,52	0,79	108,56
R19	9,03	1,83	52,14	30,76	0,05	1,29	1,04	2,55	0	1,3	1,70	98,94
R20	10,57	1,78	40,26	41,1	0,07	1	1,42	2,5	0,07	1,23	0,98	106,93
R21	10,54	2,93	40,82	39,15	0,04	1,38	0,9	3,04	0,01	1,18	1,04	103,63
R22	9,17	2,27	55,34	26,61	0,05	1,26	1,28	2,7	0,01	1,32	2,08	94,69
R23	11,2	2,79	39,49	37,81	0,06	1,63	0,98	4,34	0,03	1,67	1,04	100,23
R24	11,57	1,98	34,15	44,49	0,07	1,32	1,2	3,55	0,03	1,64	0,77	107,38
R25	9,16	2,03	53,51	29,08	0,05	1,14	0,92	2,65	0,02	1,42	1,84	97,12
R26	8,22	2,37	50,16	32,13	0,04	1,35	1,24	3,09	0,03	1,38	1,56	99,77
R27	8,24	1,78	55,94	26,72	0,06	1,14	1,51	3,06	0,03	1,52	2,09	95,58
R28	9,85	2,88	52,29	29,16	0,04	1,35	0,88	2,91	0,01	0,63	1,79	96,17
R29	11,38	1,8	35,94	43,12	0,07	1,05	1,55	3,32	0,05	1,74	0,83	106,82
R30	11,17	1,96	39,95	41,15	0,05	1,07	0,98	2,26	0	1,42	0,97	106,41
R31	5,13	1,93	79,13	5,79	0,07	1,07	2,31	2,63	0,2	1,74	13,67	79,90
R32	5,43	1,62	80,17	5,97	0,05	1,11	1,72	2,45	0,05	1,42	13,43	80,65
R33	7,84	1,53	63,82	19,11	0,05	0,8	2,2	2,71	0,16	1,78	3,34	89,72
R34	7,71	1,27	65,95	17,98	0,06	0,79	2,18	2,25	0,12	1,68	3,67	89,58
R36	9,84	1,76	45,79	35,95	0,07	0,99	1,32	2,7	0	1,59	1,27	102,69
R37	8,5	2,32	48,15	33,21	0,06	1,25	1,56	3,01	0,1	1,85	1,45	100,16
R38	5,84	1,43	74,88	10,04	0,07	0,87	2,73	2,5	0,17	1,47	7,46	83,94
R39	9,45	2,05	48,76	32,07	0,06	1,22	1,38	3,18	0,03	1,79	1,52	98,57
R40	9,05	3,05	48,92	31,98	0,06	1,47	0,93	3,36	0,02	1,15	1,53	98,20
R41	11,2	3,6	38,87	40,74	0,08	1,44	0,63	2,41	0,01	1,02	0,95	104,49
R42	9,44	1,89	57,13	25,56	0,07	0,98	1,34	2,4	0,03	1,15	2,24	94,46
R43	10,24	1,63	45,89	35,58	0,06	0,97	1,44	2,63	0,04	1,52	1,29	102,23

R44	9,47	1,82	46,82	35,53	0,06	1,01	1,39	2,45	0,04	1,42	1,32	102,90
R45	9,61	2,38	46,48	35,46	0,08	1,25	1,12	2,44	0	1,17	1,31	102,28
R46	11,02	2,02	37,14	41,92	0,07	1,25	1,46	3,38	0,08	1,65	0,89	105,70
R47	7,77	1,9	60,53	23,48	0,04	1,17	1,31	2,54	0	1,25	2,58	93,76
R47A	5,06	0	82,01	4	0,04	1,11	2,4	3,19	0,06	2,12	20,50	79,35
R48	9,41	2,51	50,36	30,61	0,03	1,3	1,23	2,99	0,03	1,53	1,65	97,30
R49	8,53	1,96	54,88	26,62	0,05	1,11	2,01	2,95	0,14	1,76	2,06	94,89
R50	8,82	2,2	48,78	33,02	0,07	1,08	1,58	2,74	0,06	1,65	1,48	100,39
R50A	8,13	2,85	52,5	30,19	0,05	1,39	1,04	2,56	0	1,28	1,74	98,26
R50B	9,24	1,93	44,72	35,4	0,07	1,1	1,66	3,51	0,1	2,27	1,26	101,08
R51	9,02	2,13	41,78	37,88	0,07	1,27	1,58	4,02	0,08	2,19	1,10	102,79
R52A	9,24	1,78	49,37	34,27	0,05	1,37	1,24	1,1	0,00005	1,59	1,44	102,80
R53	9,69	3,14	45,85	33,89	0,06	1,54	1,12	3,34	0,06	1,32	1,35	99,02
R54	9,28	2,13	48,19	33,55	0,07	1,34	1,02	3,13	0,02	1,27	1,44	100,36
R55	10,78	1,79	50,99	30,73	0,07	0,98	1,14	2,38	0	1,14	1,66	97,98
R56	9,59	2,31	50,78	31,63	0,05	1,13	1	2,25	0,01	1,25	1,61	99,25
R56A	9,89	2,45	44,8	35,52	0,06	1,3	1,39	3,11	0,05	1,43	1,26	101,15
R58	9,18	1,88	53,21	28,42	0,06	1,05	1,63	2,92	0,09	1,57	1,87	96,27
R60	11,06	2,12	35,7	45,25	0,03	1,15	0,95	2,72	0	1,02	0,79	109,83
R61	6,46	2,15	80,45	4,27	0,05	1,16	1,8	2,67	0,06	0,94	18,84	78,00
R62	9,58	2,34	50,93	31,64	0,05	1,18	0,99	2,27	0,00008	1,02	1,61	99,39
R63	11,95	1,44	34,02	46,38	0,09	0,9	1,18	2,64	0	1,4	0,73	110,52
R64	9,93	2,22	46,86	33,86	0,04	1,22	1,4	2,96	0,04	1,47	1,38	100,05
R64A	10,18	1,36	47,1	34,93	0,000004	1,11	1,4	2,6	0	1,31	1,35	102,11
R65	9,99	2,23	47,14	33,32	0,04	1,25	1,24	3,39	0,02	1,37	1,41	99,23
R66	4,92	1,88	82,44	3,91	0,04	1	2,15	2,42	0,13	1,11	21,08	79,37
R67	10,08	1,76	50,56	31,25	0,05	1,18	1,13	2,73	0	1,25	1,62	98,50
R69	9,9	2,71	48,14	32,84	0,04	1,3	0,99	2,91	0	1,18	1,47	99,06
R71	11,97	2,1	37,33	43,15	0,05	1,08	0,95	2,41	0	0,95	0,87	107,59
R72	9,71	1,4	46,14	36,1	0,06	0,96	1,4	2,78	0	1,46	1,28	103,31
R72A	7,74	1,74	50,04	32,43	0,09	1,03	1,84	3,08	0,1	1,9	1,54	100,66
R73	8,74	1,74	54,58	26,19	0,07	1,08	2,14	3,45	0,13	1,87	2,08	93,99
R73A	9,52	2,66	48,2	32,8	0,09	1,24	1,12	2,97	0	1,41	1,47	99,15
R74	11	2,9	51,16	31,83	0,09	0,6	0,67	1,12	0,03	0,61	1,61	99,66
R75	8,38	2,7	53,76	27,99	0,07	1,34	1,23	3,08	0,03	1,42	1,92	95,69
R76	9,33	2,82	40,3	37,64	0,05	1,68	1,28	4,72	0,04	2,13	1,07	100,86
R77	5,01	1,38	83,18	4,2	0,07	0,78	2,17	1,91	0,08	1,22	19,80	80,52



R78	6,17	2,37	81,3	3,61	0,04	1,25	1,67	2,45	0,03	1,12	22,52	77,49
R78A	9,41	0,47	53,7	29,94	0,07	1,13	1,2	2,79	0,04	1,26	1,79	98,99
R79	10,37	2,5	37,94	41,98	0,07	1,34	1,11	3,14	0,04	1,51	0,90	106,22
R80	9,75	1,79	48,01	34,11	0,08	0,96	1,47	2,47	0,03	1,34	1,41	101,53
R81	9,58	1,1	45,31	37,38	0,06	0,86	1,73	2,73	0,01	1,24	1,21	105,08
R82	8,25	3,13	57,39	25,95	0,04	1,25	0,97	1,92	0	1,09	2,21	95,07
R83	9,82	1,61	49,07	32,78	0,05	0,86	1,65	2,69	0,04	1,43	1,50	100,28
R84	10,79	1,74	39,47	41,89	0,07	1,08	1,14	2,69	0	1,12	0,94	107,40
R87	5,9	2,36	78,49	4,49	0,06	1,37	2,16	3,54	0,15	1,49	17,48	76,98
R88	7,98	3,03	53,98	28,18	0,05	1,47	1,18	2,8	0	1,33	1,92	96,17
R89	5,52	2,25	78,42	4,66	0,05	1,3	1,92	3,72	0,13	2,05	16,83	77,03
R91	7,85	2,24	59,13	23,64	0,05	1,09	1,6	3,11	0,12	1,16	2,50	93,06
R92	9,53	3,51	43,08	37,67	0,05	1,46	0,92	2,69	0,03	1,05	1,14	103,02
R93	10,6	2,54	38,32	41,24	0,06	1,36	1,18	3,3	0,00002	1,41	0,93	105,32
R94	5,55	1,9	76,03	9,32	0,04	1	2,24	2,52	0,15	1,26	8,16	83,30
R94B	5,07	1,57	81,99	4,32	0,06	0,86	2,26	2,19	0,11	1,58	18,98	79,78
R95	11,24	1,86	34,96	44,78	0,06	1,06	1,37	2,96	0,04	1,67	0,78	108,71
R95A	10,28	1,84	42,38	38,67	0,06	1	1,26	3,1	0,05	1,36	1,10	104,42
R96	9,97	1,78	41,47	39,97	0,07	1,09	1,33	2,85	0	1,47	1,04	105,94
R98	10,27	2,8	46,57	33,91	0,05	1,49	0,91	3,02	0,02	0,96	1,37	99,51
R98A	7,85	2,24	59,13	23,64	0,05	1,09	1,6	3,11	0,12	1,16	2,50	93,06

### Anexo 4.3 tabla de datos genotípicos para los loci *AhFAD2A* y *AhFAD2B*

Genotipo	WT	Sustitución	Inserción	Genotipo probable	Recodificación
17304-7-B	0	1	1	ol1ol1/ol2ol2	dhmut
<i>A. cardenasii</i>	1	0	0	Ol1Ol1/Ol2Ol2	dhwt
<i>A. ipaënsis</i>	1	0	0	Ol1Ol1/Ol2Ol2	dhwt
Granoléico	0	1	1	ol1ol1/ol2ol2	dhmut
JS1806	1	0	0	Ol1Ol1/Ol2Ol2	dhwt
R01	1	0	1	Ol1Ol1/ol2ol2, Ol1Ol1/Ol2ol2	smindsdmut/ht
R02	1	1	1	Ol1ol1/ol2ol2, Ol1ol1/Ol2ol2, ol1ol1/ Ol2ol2	dmndh
R03	1	1	0	Ol1ol1/Ol2Ol2, ol1ol1/Ol2Ol2	smsusdmut/ht
R04	1	0	1	Ol1Ol1/ol2ol2, Ol1Ol1/Ol2ol2	smindsdmut/ht
R05	1	1	1	Ol1ol1/ol2ol2, Ol1ol1/Ol2ol2, ol1ol1/ Ol2ol2	dmndh
R06	1	1	0	Ol1ol1/Ol2Ol2, ol1ol1/Ol2Ol2	smsusdmut/ht

R07	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R08	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R09	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R10	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R11	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R12	1	0	0	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	dhwt
R13	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R14	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R15	1	1	1	ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dhmut
R16	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R17	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R18	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R19	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R20	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R21	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R22	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R23	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R24	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R25	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R26	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R27	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R28	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R29	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R30	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R31	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R32	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R33	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R34	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R36	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R37	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R38	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R39	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R40	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R41	1	0	0	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	sminsdhmut/ht
R42	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht

R43	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R44	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R44A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R45	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R46	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R47	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R47A	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R48	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R49	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R50	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R50A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R50B	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R51	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R52	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R52A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R53	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R54	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R55	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R56	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R56A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R58	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R59	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R59A	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R60	1	1	0	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R61	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R62	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R63	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R64	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R64A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R65	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R66	0	1	1	ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dhmut
R67	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R68	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdhmut/ht
R69	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdhmut/ht
R69A	1	0	0	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	dhwt

R70	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R71	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R72	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R72A	1	0	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R73	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R73A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R74	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R75	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R76	1	0	0	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	dhwt
R77	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R78	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R78A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R79	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R80	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R81	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R82	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R83	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R84	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R85					
R86	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R87	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R88	1	0	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R89	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R91	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R92	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R93	1	0	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R94	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R94B	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R94C	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R95	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R95A	1	1	0	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> Ol <sub>2</sub>	smsusdmut/ht
R96	1	0	1	Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> Ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	smindsdmut/ht
R97	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R98	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh
R98A	1	1	1	Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , Ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> /Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub> , ol <sub>1</sub> ol <sub>1</sub> / Ol <sub>2</sub> ol <sub>2</sub>	dmndh

**Anexo 5.1** Comando UNIX Ritchie y Thompson, (1978) escrito para el filtrado de los datos genotípicos obtenidos mediante plataforma 48k SNP array for *Arachis*, Axiom *Arachis2* Clevenger *et al.*, 2018.

```
#####
```

*A. cardenasii* characteristic markers:

```
#####
```

```
egrep $^\S+\tBB\tAA\tAA\tAA' Wild_control.txt >> Acar-markers-1.txt
```

```
egrep $^\S+\tAA\tBB\tBB\tBB' Wild_control.txt >> Acar-markers-2.txt
```

```
head -7 Tetra_control.txt > Acar-markers.txt
```

```
for i in `cut -f 1 Acar-markers-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Acar-markers.txt ; done
```

```
for i in `cut -f 1 Acar-markers-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Acar-markers.txt ; done
```

```
head -7 Acar-markers.txt > Acar-markers-filter.txt
```

```
egrep $^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Acar-markers.txt >> Acar-markers-filter.txt
```

```
#####
```

*A. batizocoi* characteristic markers:

```
#####
```

```
egrep $^\S+\tBB\tAA\tBB\tBB' Wild_control.txt >> Abat-markers-1.txt
```

```
egrep $^\S+\tAA\tBB\tAA\tAA' Wild_control.txt >> Abat-markers-2.txt
```

```
head -7 Tetra_control.txt > Abat-markers.txt
```

```
for i in `cut -f 1 Abat-markers-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Abat-markers.txt ; done
```

```
for i in `cut -f 1 Abat-markers-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Abat-markers.txt ; done
```

```
head -7 Abat-markers.txt > Abat-markers-filter.txt
```

```
egrep $^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Abat-markers.txt >> Abat-markers-filter.txt
```

```
#####
```

*A. correntina* characteristic markers:

```
#####
```

```

egrep '^S+\tBB\tBB\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Acor-markers-1.txt

egrep '^S+\tAA\tAA\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Acor-markers-2.txt

head -7 Tetra_control.txt > Acor-markers.txt

for i in `cut -f 1 Acor-markers-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Acor-markers.txt ; done

for i in `cut -f 1 Acor-markers-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Acor-markers.txt ; done

head -7 Acor-markers.txt > Acor-markers-filter.txt

egrep '^S+\tbb\tbb\taa\taa' Acor-markers.txt >> Acor-markers-filter.txt

#####

Acar-cor characteristic markers:

#####

egrep '^S+\tBB\tAA\tBB\tAA\tAA' Wild_control.txt >> Acar-cor-1.txt

egrep '^S+\tAA\tBB\tAA\tBB\tBB' Wild_control.txt >> Acar-cor-2.txt

head -7 Tetra_control.txt > Acar-cor.txt

for i in `cut -f 1 Acar-cor-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Acar-cor.txt ; done

for i in `cut -f 1 Acar-cor-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Acar-cor.txt ; done

head -7 Amphi-cor.txt > Amphi-cor-markers-filter.txt

egrep '^S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-cor.txt >> Amphi-cor-markers-filter.txt

#####

Amphi-wild characteristic markers:

#####

egrep '^S+\tBB\tBB\tBB\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Amphi-wild-markers-1.txt

egrep '^S+\tAA\tAA\tAA\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Amphi-wild-markers-2.txt

head -7 Tetra_control.txt > Amphi-wild-markers.txt

for i in `cut -f 1 Amphi-wild-markers-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Amphi-wild-markers.txt ; done

for i in `cut -f 1 Amphi-wild-markers-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Amphi-wild-markers.txt ; done

head -7 Amphi-wild-markers.txt > Amphi-wild-markers-filter.txt

egrep '^S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-wild-markers.txt >> Amphi-wild-markers-filter.txt

```

#####

Amphi-card characteristic markers:

#####

```
egrep '$^\S+\tBB\tAA\tAA\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Amphi-card-markers-1.txt
```

```
egrep '$^\S+\tAA\tBB\tBB\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Amphi-card-markers-2.txt
```

```
head -7 Tetra_control.txt > Amphi-card-markers.txt
```

```
for i in `cut -f 1 Amphi-card-markers-1.txt`; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Amphi-card-markers.txt; done
```

```
for i in `cut -f 1 Amphi-card-markers-2.txt`; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Amphi-card-markers.txt; done
```

```
head -7 Amphi-card-markers.txt > Amphi-card-markers-filter.txt
```

```
egrep '$^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-card-markers.txt >> Amphi-card-markers-filter.txt
```

#####

Amphi-cord-card characteristic markers:

#####

```
egrep '$^\S+\tBB\tAA\tBB\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Amphi-cor-card-markers-1.txt
```

```
egrep '$^\S+\tAA\tBB\tAA\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Amphi-cor-card-markers-2.txt
```

```
head -7 Tetra_control.txt > Amphi-cor-card-markers.txt
```

```
for i in `cut -f 1 Amphi-cor-card-markers-1.txt`; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Amphi-card-markers.txt; done
```

```
for i in `cut -f 1 Amphi-cor-card-markers-2.txt`; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >> Amphi-cor-card-markers.txt; done
```

```
head -7 Amphi-card-markers.txt > Amphi-card-markers-filter.txt
```

```
egrep '$^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-card-markers.txt >> Amphi-card-markers-filter.txt
```

#####

Amphi-bat characteristic markers:

#####

```
egrep '$^\S+\tAA\tBB\tAA\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Amphi-bat-1.txt
```

```
egrep '$^\S+\tBB\tAA\tBB\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Amphi-bat-2.txt
```

```
head -7 Tetra_control.txt > Amphi-bat.txt
```

```
for i in `cut -f 1 Amphi-bat-1.txt`; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >> Amphi-bat.txt; done
```

```

for i in `cut -f 1 Amphi-bat-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >>
Amphi-bat.txt ; done

head -7 Amphi-bat.txt > Amphi-bat-markers.txt

egrep '$^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-bat.txt >> Amphi-bat-markers.txt

#####

Amphi-cor characteristic markers:

#####

egrep '$^\S+\tAA\tAA\tBB\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Amphi-cor-1.txt

egrep '$^\S+\tBB\tBB\tAA\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Amphi-cor-2.txt

head -7 Tetra_control.txt > Amphi-cor.txt

for i in `cut -f 1 Amphi-cor-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >>
Amphi-cor.txt ; done

for i in `cut -f 1 Amphi-cor-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >>
Amphi-cor.txt ; done

head -7 Amphi-cor.txt > Amphi-cor-markers-filter.txt

egrep '$^\S+\tbb\tbb\taa\taa' Amphi-cor.txt >> Amphi-cor-markers-filter.txt

#####

A. hypogaea characteristic markers:

#####

egrep '$^\S+\tAA\tAA\tAA\tBB\tAA' Wild_control.txt >> Ahyp-1.txt

egrep '$^\S+\tBB\tBB\tBB\tAA\tBB' Wild_control.txt >> Ahyp-2.txt

head -7 Tetra_control.txt > Ahyp.txt

for i in `cut -f 1 Ahyp-1.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/BB/bb/g" | perl -lpe "s/AA/aa/g" >>
Ahyp.txt ; done

for i in `cut -f 1 Ahyp-2.txt` ; do grep "$i" Tetra_control.txt | perl -lpe "s/AB/ab/g" | perl -lpe "s/AA/bb/g" | perl -lpe "s/BB/aa/g" >>
Ahyp.txt ; done

head -7 Ahyp.txt > Ahyp-markers.txt

egrep '$^\S+\taa\taa\tbb\tbb' Ahyp.txt >> Ahyp-markers.txt

#####

Find mapped markers in Tetra_control

#####

awk 'NR==FNR{arr[$1];next} $1 in arr' Map.txt Acor.txt > probeset_names_Acor_intro.txt

```



```
#####
```

General Filter comand

```
#####
```

```
cat Acor.txt | perl -lane 'Sk{$F[0]}=$_ ;  
  
END{  
  
open(A,"Acor.txt");  
  
while(<A>){/^(.+?)\s/; print $k{$$1}}  
  
}' Map.txt >> probeset_names_Acor_intro.txt  
  
egrep -v -f Map.txt Acor.txt > probeset_names_Acor_intro.txt
```

**Anexo 5.2** Lista de los 56 marcadores distorsionados hasta la relación 4:1 distribuidos en grupos discretos en los GL A04, A05, A07, B03 y B04. Esos grupos fueron considerados regiones de segregación distorsionada (SDRs, por sus siglas en inglés). GL: grupo de ligamiento según la obtención de los mismos en la construcción del mapa en esta tesis. Posición física según la información provista por la plataforma Axiom *Arachis2* Clevenger *et al.*, 2018.

Marcador SNP	GL	Pos. fisica
AX-147219314	A04	7322516
AX-176792711	A04	7428123
AX-147219934	A04	39970368
AX-176793117	A04	81389737
AX-176817179	A04	83508439
AX-176811783	A04	83741388
AX-176808578	A04	84945710
AX-176807331	A04	88795762
AX-176793070	A04	89523549
AX-176796616	A04	94478167
AX-176793394	A04	94791855
AX-176803416	A04	105051294
AX-176802673	A04	114014458
AX-176822693	A04	114154224
AX-176794579	A04	117875288

AX-147221165	A04	119374144
AX-176810160	A04	119408015
AX-176802579	A04	119417930
AX-176800870	A04	119545034
AX-147248386	A04	123656503
AX-176805306	A04	124539854
AX-147248621	A04	128496743
AX-176808654	A04	128699808
AX-176811054	A04	129307175
AX-176817316	A04	129479662
AX-176796174	A05	15450246
AX-176812244	A05	17469431
AX-176803364	A05	17537359
AX-176792516	A05	18124006
AX-177639717	A05	18256661
AX-176803431	A05	18915705
AX-176810269	A05	20131737
AX-176818003	A05	22450498
AX-176823380	A05	27917424
AX-176816005	A07	26578065
AX-176792488	A07	30747543
AX-176813529	B03	16335101
AX-147216237	B03	19457122
AX-176815041	B03	32310567
AX-176793472	B03	82076273
AX-176824252	B03	96162832
AX-176814446	B03	108913899
AX-176820136	B03	110192673
AX-176812836	B03	110850153
AX-176824260	B03	111867944
AX-176818776	B03	115500602
AX-176821580	B03	116122591
AX-176807237	B03	117746962
AX-176813062	B03	119465517
AX-176811750	B03	121862733
AX-147247121	B04	11424470
AX-176817817	B04	21646741

AX-176802690	B04	41548917
AX-176813435	B04	81313988
AX-176797072	B04	101652916
AX-176796035	B04	105357048

**Anexo 5.3** Lista de los 236 SNPs estadísticamente significativos ( $P = 0.01$ ) resultantes del un análisis de asociación marcador-fenotipo. El análisis de asociación se realizó con una regresión lineal simple entre los marcadores SNPs y la incidencia de carbón del maní. Todos los marcadores con p-valor  $< 0.05$  fueron considerados asociados con la variación fenotípica. La posición física está basada en la información de la plataforma Axiom Arachis2 (Clevenger *et al.*, 2018)

Marker	chr	p.value	Physical position (bp)
AX-177637682	A08	5.15E-05	52576684
AX-176818570	A08	5.47E-05	4314674
AX-176805611	A08	6.10E-05	111851182
AX-147229403	A08	8.22E-05	4873972
AX-147212761	A02/B02	0.000190896	2907720
AX-176792382	A08	0.000240296	105903204
AX-176801945	A08	0.000243674	104468847
AX-177640169	A08	0.000253171	103150738
AX-176813878	A08	0.00026665	111251556
AX-176793067	A08	0.000373459	4388602
AX-176809466	A08	0.000373459	4403235
AX-177640532	A08	0.00038226	103237126
AX-177638864	A08	0.000437559	97455577
AX-176802726	A07	0.000491068	115274919
AX-176799959	A08	0.000565781	112950513
AX-176816055	A07	0.00077419	40324562
AX-176801544	A01	0.000792614	121795030
AX-177637427	A08	0.000847539	104195938
AX-176803782	A07	0.000849582	39433852

AX-176820999	A07	0.000904017	100889557
AX-176815271	A07	0.001035695	55283469
AX-176809445	A07	0.001052427	85322664
AX-176818565	A07	0.001059466	55186930
AX-147212854	A02/B02	0.001086192	3563958
AX-176813017	A07	0.001191962	27420405
AX-176813945	A01	0.001241793	121460689
AX-176799573	A07	0.001262132	42955508
AX-177639801	A07	0.001313897	62271988
AX-176802987	A07	0.001418292	19639458
AX-176800287	A08	0.00149842	7520037
AX-177638186	A07	0.001885857	19641821
AX-176820517	A07	0.001926944	114568297
AX-176816092	A07	0.001954979	19640787
AX-176798715	A07	0.002016407	26484577
AX-176815808	A07	0.002087739	92446909
AX-176799386	A08	0.002104217	6872380
AX-176805977	A07	0.002183406	24117720
AX-176807821	B07	0.002197946	30529877
AX-177639631	A07	0.002234888	61298594
AX-176806837	A07	0.002250911	38862807
AX-176814500	A08	0.002296828	3576545
AX-176820439	A08	0.002296828	98689414
AX-176821695	A08	0.002296828	98547513
AX-177638208	A08	0.002296828	98315632
AX-176803609	A01	0.002338463	104121701
AX-177638245	A07	0.002463019	24823943
AX-177637338	B07	0.00248221	32869118
AX-176817825	A07	0.00273915	19637966
AX-176816076	A07	0.002818963	28614251
AX-176808088	A07	0.002826054	27364019
AX-177638207	A08	0.002829794	97835514

AX-176796294	A07	0.002921095	19640950
AX-176805566	A07	0.002934356	28944423
AX-147258679	A07	0.002978044	106274380
AX-147258683	A07	0.002978044	106275534
AX-147258685	A07	0.002978044	106275894
AX-177643132	A07	0.002978044	106275030
AX-177644438	A07	0.002978044	131182920
AX-176792434	A07	0.003075709	19638551
AX-176793162	A07	0.003075709	19643686
AX-176794375	A07	0.003075709	19642232
AX-176794604	A07	0.003075709	19638601
AX-176794658	A07	0.003075709	19640936
AX-176794665	A07	0.003075709	19642386
AX-176795094	A07	0.003075709	19638538
AX-176796369	A07	0.003075709	27362842
AX-176796372	A07	0.003075709	19640240
AX-176796562	A07	0.003075709	19643081
AX-176796640	A07	0.003075709	28179489
AX-176797040	A07	0.003075709	19638659
AX-176797154	A07	0.003075709	19637684
AX-176797254	A07	0.003075709	19640814
AX-176798150	A07	0.003075709	27363412
AX-176798667	A07	0.003075709	19640484
AX-176798775	A07	0.003075709	19642392
AX-176798930	A07	0.003075709	19642017
AX-176799137	A07	0.003075709	19642093
AX-176799444	A07	0.003075709	19642243
AX-176799558	A07	0.003075709	19642480
AX-176799773	A07	0.003075709	19640308
AX-176800900	A07	0.003075709	19640247
AX-176801381	A07	0.003075709	19642289
AX-176801587	A07	0.003075709	19642385

AX-176801743	A07	0.003075709	19640311
AX-176802006	A07	0.003075709	19638931
AX-176802210	A07	0.003075709	19640099
AX-176802515	A07	0.003075709	19640852
AX-176802713	A07	0.003075709	19643540
AX-176803442	A07	0.003075709	19637754
AX-176803760	A07	0.003075709	19639954
AX-176804163	A07	0.003075709	19643753
AX-176804235	A07	0.003075709	27363568
AX-176805924	A07	0.003075709	19640180
AX-176806406	A07	0.003075709	19642919
AX-176806579	A07	0.003075709	19643319
AX-176806596	A07	0.003075709	19642457
AX-176806795	A07	0.003075709	27361575
AX-176807458	A07	0.003075709	19640244
AX-176807804	A07	0.003075709	19640922
AX-176807887	A07	0.003075709	19638276
AX-176808628	A07	0.003075709	19639330
AX-176808802	A07	0.003075709	19639920
AX-176808968	A07	0.003075709	19644214
AX-176810518	A07	0.003075709	19639966
AX-176810637	A07	0.003075709	19639624
AX-176811945	A07	0.003075709	19643347
AX-176812295	A07	0.003075709	19642463
AX-176812902	A07	0.003075709	19642779
AX-176812952	A07	0.003075709	19643559
AX-176813375	A07	0.003075709	19641176
AX-176814269	A07	0.003075709	27644129
AX-176814551	A07	0.003075709	19642265
AX-176814859	A07	0.003075709	19642394
AX-176814915	A07	0.003075709	19639068
AX-176815841	A07	0.003075709	18241987

AX-176815878	A07	0.003075709	19638419
AX-176817071	A07	0.003075709	19643186
AX-176817339	A07	0.003075709	19643922
AX-176818250	A07	0.003075709	19639453
AX-176818514	A07	0.003075709	19640491
AX-176818647	A07	0.003075709	19643594
AX-176820379	A07	0.003075709	19638044
AX-176823508	A07	0.003075709	19641844
AX-176823773	A07	0.003075709	19642844
AX-177637220	A07	0.003075709	19638912
AX-177637282	A07	0.003075709	19638586
AX-177637685	A07	0.003075709	19643617
AX-177637969	A07	0.003075709	27362912
AX-177638153	A07	0.003075709	19640863
AX-177638176	A07	0.003075709	27365504
AX-177638835	A07	0.003075709	19643562
AX-177638848	A07	0.003075709	19643644
AX-177638907	A07	0.003075709	19639561
AX-177639325	A07	0.003075709	27363529
AX-177639396	A07	0.003075709	19641213
AX-177639461	A07	0.003075709	27362795
AX-177639654	A07	0.003075709	27362105
AX-177639758	A07	0.003075709	19640160
AX-177640558	A07	0.003075709	19638180
AX-177644513	A07	0.003075709	19639405
AX-177644575	A07	0.003075709	19639299
AX-176801553	A07	0.003135537	24958364
AX-176806592	A07	0.003135537	30829137
AX-176811582	B02	0.003261408	15978723
AX-177638572	B07	0.003365198	23108944
AX-176793421	A07	0.003377889	54239494
AX-176791404	A08	0.003424309	102291963

AX-176796960	A07	0.003426766	26390001
AX-147228138	A07	0.003476711	28118653
AX-176817947	A07	0.003544378	101858265
AX-176812163	A07	0.003618038	28659304
AX-176806409	A07	0.003666335	19643690
AX-176812424	A07	0.003762047	43976708
AX-176817935	A07	0.003762047	96965539
AX-176800881	A07	0.003797372	19640285
AX-177638957	A07	0.003842348	19641822
AX-176815250	A07	0.003942391	28154366
AX-176817846	A07	0.003942391	28037619
AX-176793385	A07	0.004073999	53299057
AX-176792710	A07	0.004076803	19641649
AX-176801387	A07	0.004119264	49364480
AX-176817932	A07	0.00420455	96048496
AX-176797221	A08	0.004269454	101225100
AX-176808079	A07	0.004278174	19639419
AX-177642385	B09	0.004362213	12659192
AX-176815269	A07	0.004365575	49701881
AX-176794442	B09	0.004471329	13151882
AX-177643146	B09	0.004471329	12518764
AX-147228333	A07	0.004526742	45819429
AX-147228341	A07	0.004526742	45942702
AX-176803234	A07	0.004526742	43817432
AX-176805714	A07	0.004526742	106118827
AX-176807670	A07	0.004526742	102567142
AX-176807772	A07	0.004526742	101547178
AX-177638242	A07	0.004526742	93445772
AX-176807727	A07	0.004540303	19634078
AX-176794984	A01	0.004553155	104070151
AX-177637534	B09	0.004825916	11016521
AX-176806498	B07	0.004830261	7562466



AX-176795278	B07	0.004835662	32658923
AX-177638082	B07	0.004835662	32871663
AX-147228434	A07	0.004874997	54334742
AX-176794504	A07	0.004874997	129311474
AX-176794936	A07	0.004874997	105532652
AX-176799807	A07	0.004874997	103258895
AX-176802597	A07	0.004874997	106146502
AX-176812224	A07	0.004874997	109791309
AX-176814495	A08	0.004910118	126884497
AX-176804678	A07	0.004929293	27815719
AX-176823633	B07	0.004971972	31156944
AX-147258684	A07	0.005101744	106275540
AX-176817941	A07	0.005199901	103194207
AX-176792278	A07	0.005320897	19638262
AX-176796811	A07	0.005320897	19639017
AX-177638946	A07	0.005358853	31006238
AX-176807223	A07	0.005753167	43231088
AX-176802118	A07	0.005806859	72951266
AX-147227779	A07	0.0058716	13714703
AX-177641897	A07	0.005878379	49886183
AX-177640777	A07	0.005879923	31122713
AX-176797598	B07	0.005949829	28207052
AX-176803142	B07	0.005963848	25682989
AX-176799215	A08	0.006024444	132071413
AX-147228228	A07	0.006117866	35350479
AX-177637880	B07	0.006310014	12758016
AX-176800926	A07	0.0063191	27363729
AX-176810227	B03	0.0063548	3732774
AX-176810836	A08	0.006514761	121290612
AX-177638966	A07	0.006544363	47907814
AX-176797133	A07	0.006686541	98689510
AX-177637177	A07	0.00674314	58642890

AX-176807359	A07	0.006812245	27918479
AX-176805027	A07	0.006964176	19640970
AX-176812218	A07	0.00738961	19100209
AX-176815246	A07	0.007629973	23798929
AX-176798213	A07	0.007650587	19641223
AX-176809163	A07	0.007650587	19634082
AX-176805052	A07	0.007677903	30058841
AX-177638107	B07	0.007718117	38604277
AX-176821998	A07	0.007983395	131185894
AX-176794108	A07	0.007987658	19639066
AX-177638786	A07	0.008196192	27363485
AX-176801484	A07	0.008235525	19639611
AX-176824167	A07	0.008235525	19638797
AX-177637731	B07	0.008676704	28000599
AX-176796114	A07	0.008748755	24547647
AX-176793983	A07	0.008762198	19638311
AX-176793953	A07	0.008898268	10048677
AX-176806530	B07	0.009039545	30845972
AX-176803647	B07	0.009048915	31569603
AX-176795007	A07	0.009102416	27363683
AX-176802982	A07	0.009284856	19640454
AX-177644547	B07	0.009338007	17400993
AX-176818629	A07	0.009412418	30058467
AX-176823879	B07	0.009659184	51307513
AX-176795072	A01	0.009998853	104310686

**Anexo 5.4** Análisis del contenido de modelos de genes dentro de los intervalos detectados en esta tesis. Los intervalos se determinaron para la posición física de los dos QTL basandose en la información del transcriptoma del cv. Tifrunner Clevenger *et al.*, 2016 (<https://peanutbase.org>). <sup>a</sup>Identificador del gen como aparece en la base de datos GeneDB ; <sup>b</sup>Descripción de la familia de genes e identificador de la función protéica

(cuando estaba disponible) disponible en [www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/); <sup>c</sup>ID del cromosoma de *Arachis hypogaea*; <sup>d</sup>Un punto indica expresión génica en tejido reproductivo; <sup>e</sup>Un punto indica expresión génica en la etapa fenológica de ginóforo aéreo (momento en que el clavo aéreo comienza su movimiento geotrópico, denominado por Clevenger *et al.*, 2016 como *peg basipetal*) y clavado del ginóforo (momento en que el ginóforo se ha introducido en el suelo y comienza a desarrollarse el fruto, denominado por Clevenger *et al.*, 2016 como *platee 1*). Lista completa de los modelos de genes en los intervalos físicos de los QTLs qSmIA08 (1.23 Mbp - 6.04 Mbp) y qSmIA02/B02 (3.43 - 4.29 Mbp).

Identificador del gen como aparece en GeneDB <sup>a</sup>	Familia de genes <sup>b</sup>	Cromosoma <sup>c</sup>	Alta densidad de transcritos en tejidos reproductivos <sup>d</sup>	Alta densidad de transcritos entre los estados de ginóforo aéreo y clavado <sup>e</sup>
arahy.H2EMZS	Leucine-rich repeat IPR001611	Arahy.08	•	•
arahy.1VZ0XU	Leucine-rich repeat IPR001611	Arahy.08	•	•
arahy.G3GLY0	Mlo-related protein IPR004326	Arahy.08	•	•
arahy.ZD1HZA	Mlo-related protein IPR004326	Arahy.08	•	
arahy.KK00U0	NAC domain IPR003441	Arahy.08	•	
arahy.PYV8LV	Mlo-related protein IPR004326	Arahy.08	•	•
arahy.R41ZPC	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•
arahy.8JIA13	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•
arahy.M9ABLH	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000157	Arahy.12	•	•
arahy.H64XLR	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•

arahy.KB2A5J	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•
arahy.6FL6BZ	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•
arahy.Q0H19F	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.Q9VKE2	Putative disease resistance protein At3g14460-like isoform X1	Arahy.12	•	•
arahy.ZRWQ57	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR002182	Arahy.12	•	•
arahy.JV8YGH	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR002182	Arahy.12	•	•
arahy.IK9KMC	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.W26JNR	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.BSP416	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.VH2EIV	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR001611	Arahy.12	•	•

arahy.9TA9MT	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.NKRN6N	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.4I1C2	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.66HKIQ	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.NMJE7X	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.1DE133	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.QREM2V	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.DV2E4X	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	Arahy.12	•	•
arahy.CUPK9N	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.8U5YS2	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	Arahy.12	•	•

arahy.KD5YG3	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.0C19HY	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.V6I7WA	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.TE7I1T	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	Arahy.12	•	•
arahy.0EHV1A	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) IPR000767	Arahy.12	•	•
arahy.KAG5PZ	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein IPR002182	Arahy.12		
arahy.W2W4JI	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	Arahy.12		
arahy.60VTT9	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	Arahy.02	•	•
arahy.AL4TLG	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	Arahy.02	•	•
arahy.HEBF57	disease resistance protein [Glycine max]	Arahy.02	•	•
arahy.SL8FFE	disease resistance protein [Glycine max]	Arahy.02	•	•

arahy.U433IA	disease resistance protein [Glycine max]	Arahy.02	•	•
arahy.V7RGM7	disease resistance protein [Glycine max]	Arahy.02	•	•
arahy.Y56548	disease resistance protein [Glycine max]	Arahy.02	•	•

**Anexo Script R** Comandos utilizados en lenguaje R para los paquetes de análisis utilizados en esta tesis.

```
setwd("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype")
```

```
library(ggplot2)
```

```
library(tidyr)
```

```
library(reshape2)
```

```
library(dendextend)
```

```
library(factoextra)
```

```
library(NbClust)
```

```
library(pvclust)
```

```
library(flexclust)
```

```
library(readxl)
```

```
library(tidyverse)
```

```
library(ggtree)
```

```
library(ggdendro)
```

```
library(ggfortify)
```

```
library(devtools)
```

```
library(corrplot)
```

```
library(vegan)
```

```
library(ggbiplot)
```

```

library(scico)

devtools::install_github("vsimko/corrplot")

Morfo <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/Morfo_ave.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Morfo <- Morfo %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotype")

i <- c(1:39)

Morfo[, i] <- apply(Morfo[, i], 2, # Specify own function within apply
  function(x) as.numeric(as.character(x)))

sapply(Morfo, class)

str(Morfo)

#histogramas

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed",)

v <- melt(Morfo, id=9:39)

ggplot(v,aes(x = value)) +

  facet_wrap(~variable,scales = "free_x") +

  geom_histogram() + labs(title= NULL,

  y="Frecuencia", x = "Valor")

v2 <- melt(Morfo, id=c(1:8,16:18,27:39))

ggplot(v2,aes(x = value)) +

  facet_wrap(~variable,scales = "free_x") +

  geom_histogram() + labs(title= NULL,

  y="Frecuencia", x = "Valor")

v3 <- melt(Morfo, id=1:26)

ggplot(v3,aes(x = value)) +

  facet_wrap(~variable,scales = "free_x") +

  geom_histogram() + labs(title= NULL,

  y="Frecuencia", x = "Valor")

```



```

Inc_IE <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/Feno_IE_Inc.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Inc_IE <- Inc_IE %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotipo")

v4 <- Inc_IE$t_DI

v4 <- as.data.frame(v4)

v5 <- Inc_IE$t_Incidence

v5 <- as.data.frame(v5)

p<-ggplot(v4, aes(x=v4)) +

  geom_histogram(binwidth=0.07, color="grey50", fill="grey70")+

  labs(title= NULL,

  y="Frecuencia", x = "IE", cex=0.8)

p

p<-ggplot(v5, aes(x=v5)) +

  geom_histogram(binwidth=0.07, color="grey50", fill="grey70")+

  labs(title= NULL,

  y="Frecuencia", x = "Incidencia", cex=0.8)

p

#Scott and Knott variables cuantitativas

#LF_RL

LF_RL<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_F_RL.csv",

  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LF_RL <- as.factor(LF_RL$Grupo)

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed",)

g1 <- ggplot(data = LF_RL, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LF_RL)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.8) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del folíolo de la rama lateral", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

  panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

```

```

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 19, yend = 19.2,
size=0.3, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 50, yend = 50.2,
size=0.3, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#LR_RL
LR_RL<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_R_RL.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LR_RL <- as.factor(LR_RL$Grupo)

g1 <- ggplot(data = LR_RL, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LR_RL)))
g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))
g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))
g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del raquis de la rama lateral", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 7.6, yend = 7.8,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 12, yend = 12.2,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#LP_RL
LP_RL<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_P_RL.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LP_RL <- as.factor(LP_RL$Grupo)

g1 <- ggplot(data = LP_RL, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LP_RL)))

```

```

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del peciolo de la rama lateral", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 9, yend = 9.2,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 50.2, yend = 50.4,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#LF_EC
LF_EC<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_F_EC.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LF_EC <- as.factor(LF_EC$Grupo)

g1 <- ggplot(data = LF_EC, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LF_EC)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del foliolo del eje central", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 30.22, yend = 30.24,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 44.9, yend = 45.1,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

```

```

#AF_EC

AF_EC<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_A_F_EC.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_AF_EC <- as.factor(AF_EC$Grupo)

g1 <- ggplot(data = AF_EC, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_AF_EC)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del ancho del foliolo del eje central", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),

text = element_text(size=12, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 16.14, yend = 16.16,

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 23.14, yend = 23.16,

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#LR_EC

LR_EC<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_R_EC.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LR_EC <- as.factor(LR_EC$Grupo)

g1 <- ggplot(data = LR_EC, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LR_EC)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del raquis del eje central", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),

text = element_text(size=12, family="Arial")) +

```

```

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 8.9, yend = 9.1,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 13.29, yend = 13.31,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#LP_EC

LP_EC<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_L_P_EC.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_LP_EC <- as.factor(LP_EC$Grupo)

g1 <- ggplot(data = LP_EC, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_LP_EC)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del largo del peciolo del eje central", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 25.69, yend = 25.71,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 43.39, yend = 43.41,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

#P_25sem

P_25sem<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/SK_gr_25_sem.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_P_25sem <- as.factor(P_25sem$Grupo)

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed",)

g1 <- ggplot(data = P_25sem, aes(x = reorder(Genotype, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_P_25sem)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

```

```

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media del peso en gr de 25 semillas", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 3.46, yend = 3.48,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 19.50, yend = 19.52,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

###Scott and Knott carbón

Inc<- read.table("/home/francisco/R/SNPs/Rils_files_mapping/Rqt/First analysis/Sk_table.csv", sep = ",", header = TRUE)

Group <- as.factor(Inc$Group)

attach(Inc)

setwd("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype")

png("ScotKnottPlot.png", units="in", width=9, height=5, res=300, compression = 'lz')

png(filename = "ScotKnottPlot.png",
width = 9, height = 5, units = "in", pointsize = 10,
bg = "white", res = 300, type = c("cairo"))

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed",)

g1 <- ggplot(data = Inc, aes(x = reorder(Genotype, Mean), y = Mean, color = factor(Group)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Incidencia promedio", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +

```

```

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 0.01, yend = 0.02,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "173047B", xend = "173047B", y = 0.57, yend = 0.58,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808")

g6

dev.off()

Inc<- read.table("/home/francisco/R/SNPs/Rils_files_mapping/Rqt/First analysis/Sk_table.csv", sep = ",", header = TRUE)

Group <- as.factor(Inc$Group)

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed")

g1 <- ggplot(data = Inc, aes(x = reorder(Genotype, Mean), y = Mean, shape = factor(Group)))

g2 <- g1 + geom_point(aes(shape=Group))

g3 <- g2 + labs(x = "Genotype", shape = "Group", y = "Mean Incidence", size = 18)

g4 <- g3 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g5 <- g4 + theme(axis.text.x = element_text(size = 9,angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=14, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 0.01, yend = 0.02,
size=0.5, arrow=arrow) +

annotate("segment", x = "173047B", xend = "173047B", y = 0.57, yend = 0.58,
size=0.5, arrow=arrow)

g5

# matriz de distancia del paquete {stats}

morfo.dist <- dist(Morfo, method="euclidean")

max(morfo.dist)

HC.morfo <- hclust(morfo.dist, method="ward.D2")

morfo.clusters <- cutree(HC.morfo, k = 4)

morfo.clusters <- as.data.frame(morfo.clusters)

Morfo.clust <- cbind(Morfo, morfo.clusters)

```

```

write_csv(Morfo.clust, "/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/Morfo_clust.csv")

colors = c("#EE6363", "#8B668B", "#008B00", "#66CDAA")

clus4 = cutree(HC.morfo, 4)

fviz_dend(HC.morfo, cex = 0.55, k = 4,

color_labels_by_k = TRUE, lwd = 0.5, ylab = "Distancia",

main = NULL, rect = TRUE)

fviz_dend(HC.morfo, cex = 0.5, repel = TRUE, k = 4, horiz = TRUE, main = NULL,

color_labels_by_k = TRUE, lwd = 0.5, ylab = "Distancia", rect = TRUE)

fviz_dend(HC.morfo, main=NULL,cex = 0.7, k = 4, color_labels_by_k = TRUE, label_cols = NULL,

type = "circular", lwd=0.5)

source("https://github.com/traffordDataLab/assets/raw/master/theme/ggplot2/theme_lab.R")

fviz_dend(HC.morfo, k = 4,

cex = 0.65,

k_colors = c("grey40", "grey40", "grey40", "grey40"),

color_labels_by_k = TRUE,

rect = TRUE,

rect_border = c("darkgoldenrod1", "#008B00", "darkmagenta", "grey70"),

rect_fill = TRUE)+

labs(title = NULL,

subtitle = NULL,

caption = NULL,

x = NULL,

y = NULL,

fill = NULL) +

xlab(NULL)+

ylab(NULL)+

theme_lab()+

theme(panel.grid.major.x = element_blank()),

```



```

legend.position = "right")

str(Morfo)

PC <- prcomp(~., data=Morfo[, -c(16:18)], na.action=na.omit, center = TRUE, scale=TRUE)

summary(PC)

data <- Morfo.clust[, -c(16:18)]

PCi <- data.frame(PC$x, Grupo=morfo.grup)

PCi$Grupo <- as.factor(PCi$Grupo)

ggplot(PCi, aes(x=PC1, y=PC3, col=Grupo)) +

  geom_point(size=2, alpha=0.7) + ylim(c(-6, 12)) + xlim(c(-6, 12)) + #Size and alpha just for fun

  scale_color_manual(values = c("darkgoldenrod1", "#008B00", "grey60", "darkmagenta")) + #your colors here

  theme_classic()

morfo.grup <- Morfo.clust[-49,]

morfo.grup <- morfo.grup$morfo.clusters

#ggbiplot(morfo.pca, ellipse=TRUE, var.axes = FALSE,

  #labels=rownames(Morfo[-c(2:4,49),]), groups=morfo.grup)

autoplot(PC, data= Morfo[-49, -c(16:18)], ylim= c(-0.1,0.6), xlim= c(-0.1,0.6), loadings = TRUE,

  loadings.colour = "grey70", labels.colour = "grey50",

  loadings.label = TRUE, loadings.label.size = 2, labels=TRUE,

  loadings.label.repel=TRUE)

#análisis de correlación

Morfo.corr <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/morfo_carb_corr.csv",

  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Morfo.corr <- Morfo.corr %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotype")

#correlación

M <- cor(Morfo.corr[-49,])

#color spectrums

col2 <- colorRampPalette(c("#67001F", "#B2182B", "#D6604D", "#F4A582", "#FDDBC7",

  "#FFFFFF", "#D1E5F0", "#92C5DE", "#4393C3", "#2166AC", "#053061"))

#corr significance test

```

```

cor.mtest <- function(mat, conf.level = 0.95){

  mat <- as.matrix(mat)

  n <- ncol(mat)

  p.mat <- lowCI.mat <- uppCI.mat <- matrix(NA, n, n)

  diag(p.mat) <- 0

  diag(lowCI.mat) <- diag(uppCI.mat) <- 1

  for(i in 1:(n-1)){

    for(j in (i+1):n){

      tmp <- cor.test(mat[,i], mat[,j], conf.level = conf.level)

      p.mat[i,j] <- p.mat[j,i] <- tmp$p.value

      lowCI.mat[i,j] <- lowCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[1]

      uppCI.mat[i,j] <- uppCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[2]

    }

  }

  return(list(p.mat, lowCI.mat, uppCI.mat))

}

res1 <- cor.mtest(Morfo.corr[-49,],0.95)

## leave blank on no significant coefficient

png("color_corr.png", width = 750,height = 800)

corrplot(M, p.mat = res1[[1]], diag = FALSE,insig = "blank", type="lower",

  method = "color", order = "hclust", col= col2(50), cl.cex = 0.5,

  tl.cex = 0.6, tl.col = "grey32", tl.srt = 45)

dev.off()

png("num_corr.png", width = 680,height = 650)

corrplot(M, p.mat = res1[[1]],insig = "blank", type="lower", method = "number",

  order = "hclust", col = "grey20",

  number.cex = 0.35, diag= FALSE,

  cl.pos = "n", tl.cex = 0.6, tl.col = "grey32", tl.srt = 45)

dev.off()

```

```

tMorfo <- t(Morfo[-49,-c(16:18)])

tMorfo <- as.data.frame(tMorfo)

shannon <- diversity(tMorfo, index="shannon")

summary(shannon)

simpson <- diversity(tMorfo, index= "simpson")

summary(simpson)

Shannon <- as.data.frame(shannon)

Simpson <- as.data.frame(simpson)

write.csv(Shannon, "/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/Shannon.csv")

write.csv(Simpson, "/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Phenotype/Simpson.csv")

#ANÁLISIS PROXIMAL

Proxi<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/Prox_mean.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Proxi <- Proxi %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotipo")

i <- c(1:5)

Proxi[, i] <- apply(Proxi[, i], 2, # Specify own function within apply
  function(x) as.numeric(as.character(x)))

sapply(Proxi, class)

AG<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/Perfil_AG.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

AG <- AG %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotipo")

i <- c(1:10)

AG[, i] <- apply(AG[, i], 2, # Specify own function within apply
  function(x) as.numeric(as.character(x)))

sapply(AG, class)

d <- melt(Proxi[,c(1:5)])

ggplot(d,aes(x = value)) +
  facet_wrap(~variable,scales = "free_x") +
  geom_histogram() + labs(title= NULL,

```

```

y="Frecuencia", x = "Contenido %")

d1 <- melt(AG[,c(1:10)])

ggplot(d1,aes(x = value)) +

facet_wrap(~variable,scales = "free_x") +

geom_histogram() + labs(title= NULL,

y="Frecuencia", x = "Contenido %")

#Scott and Knott química proximal y perfil de AG

#Grasa

Grasa<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/SK_Grasa.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

arrow = arrow(angle= 15, ends = "first", type="closed",)

g1 <- ggplot(data = Grasa, aes(x = reorder(Genotipo, Medias), y = Medias, color = Grupo))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f", "#36648B"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media en % del contenido proximal de grasa total", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),

text = element_text(size=12, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 49, yend = 49.2,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 53.38, yend = 53.4,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#080808") +

annotate("segment", x = "A.bat", xend = "A.bat", y = 51.6, yend = 51.8,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#87CEFA") +

annotate("segment", x = "A.corr", xend = "A.corr", y = 48.6, yend = 48.8,

size=0.3,arrow=arrow, colour= "#458B00") +

annotate("segment", x = "A.card", xend = "A.card", y = 53.9, yend = 54.1,

size=0.3,arrow=arrow, colour= "#FFD700")

```

g6

#Fibra

```
Fibra<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/SK_Fibra.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_Fibra <- as.factor(Fibra$Grupo)

g1 <- ggplot(data = Fibra, aes(x = reorder(Genotipo, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_Fibra)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854",
  "#ffd92f", "#36648B", "#8B8B00"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media en % del contenido proximal de fibra", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
  panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
  text = element_text(size=12, family="Arial")) +
  annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 8.99, yend = 9.01,
  size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
  annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 11.39, yend = 11.41,
  size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808") +
  annotate("segment", x = "A.bat", xend = "A.bat", y = 9.32, yend = 9.4,
  size=0.3, arrow=arrow, colour= "#87CEFA") +
  annotate("segment", x = "A.corr", xend = "A.corr", y = 9.2, yend = 9.3,
  size=0.3,arrow=arrow, colour= "#458B00") +
  annotate("segment", x = "A.card", xend = "A.card", y = 8.2, yend = 8.4,
  size=0.3,arrow=arrow, colour= "#FFD700")
```

g6

#Azúcares

```
Azúcares<- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/SK_AzúcaresTotales.csv",
  sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_Az <- as.factor(Azúcares$Grupo)
```

```

g1 <- ggplot(data = Azúcares, aes(x = reorder(Genotipo, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_Az)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f", "#36648B"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media en % del contenido proximal de azúcares totales", size = 14)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),
text = element_text(size=12, family="Arial")) +
annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 4.32, yend = 4.34,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +
annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 4.46, yend = 4.48,
size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808") +
annotate("segment", x = "A.bat", xend = "A.bat", y = 3.6, yend = 3.7,
size=0.3, arrow=arrow, colour= "#87CEFA") +
annotate("segment", x = "A.corr", xend = "A.corr", y = 3.56, yend = 3.61,
size=0.3,arrow=arrow, colour= "#458B00") +
annotate("segment", x = "A.card", xend = "A.card", y = 3, yend = 3.1,
size=0.3,arrow=arrow, colour= "#FFD700")

g6

#LF_EC

Prot <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/SK_Proteínas.csv",
sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_Prot <- as.factor(Prot$Grupo)

g1 <- ggplot(data = Prot, aes(x = reorder(Genotipo, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_Prot)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854",
"#ffd92f", "#36648B", "#8B8B00"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media en % del contenido proximal de proteínas", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

```

```

panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),

text = element_text(size=12, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 33.30, yend = 33.32,

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 28.2, yend = 28.4,

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808") +

annotate("segment", x = "A.bat", xend = "A.bat", y = 33.1, yend = 33.2,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#87CEFA") +

annotate("segment", x = "A.corr", xend = "A.corr", y = 36, yend = 36.1,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#458B00") +

annotate("segment", x = "A.card", xend = "A.card", y = 32.6, yend = 32.7,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#FFD700")

g6

#Cenizas

Cenizas <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/SK_Cenizas.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

Grup_Cen <- as.factor(Cenizas$Grupo)

g1 <- ggplot(data = Cenizas, aes(x = reorder(Genotipo, Medias), y = Medias, color = factor(Grup_Cen)))

g2 <- g1 + scale_colour_manual(values = c("#66c2a5", "#fc8d62", "#8da0cb", "#e78ac3", "#a6d854", "#ffd92f"))

g3 <- g2 + geom_point (size= 2, alpha= 0.7) +scale_x_discrete(expand=c(0, 2))

g4 <- g3 + labs(x = "Genotipo", colour = "Grupo", y = "Media en % del contenido proximal de cenizas", size = 18)

g5 <- g4 + theme_bw() + theme(panel.border = element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),

panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour = "black"))

g6 <- g5 + theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, vjust = 0.8, hjust = 1, colour = "black"),

text = element_text(size=12, family="Arial")) +

annotate("segment", x = "JS1806", xend = "JS1806", y = 2.47, yend = 2.49,

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#A1A1A1") +

annotate("segment", x = "17304-7-B", xend = "17304-7-B", y = 2.33, yend = 2.35,

```

```

size=0.5, arrow=arrow, colour= "#080808") +

annotate("segment", x = "A.bat", xend = "A.bat", y = 2.78, yend = 2.8,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#87CEFA") +

annotate("segment", x = "A.corr", xend = "A.corr", y = 3.06, yend = 3.1,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#458B00") +

annotate("segment", x = "A.card", xend = "A.card", y = 3.25, yend = 3.27,

size=0.3, arrow=arrow, colour= "#FFD700")

g6

# matriz de distancia del paquete {stats}

AG.dist <- dist(AG, method="euclidean")

HC.AG <- hclust(AG.dist, method="ward.D")

AG.clusters <- cutree(HC.AG, k = 4)

AG.clusters <- as.data.frame(AG.clusters)

AG.clust <- cbind(AG, AG.clusters)

write_csv(AG.clust, "/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/AG_clust.csv")

colors = c("#EE6363", "#8B668B", "#008B00", "#66CDAA")

clus4 = cutree(HC.AG, 4)

source("https://github.com/traffordDataLab/assets/raw/master/theme/ggplot2/theme_lab.R")

fviz_dend(HC.AG, k = 4,

cex = 0.65,

k_colors = c("grey40", "grey40", "grey40", "grey40"),

color_labels_by_k = TRUE,

rect = TRUE,

rect_border = c("darkgoldenrod1", "#008B00", "grey70", "darkmagenta"),

rect_fill = TRUE)+

labs(title = NULL,

subtitle = NULL,

caption = NULL,

x = NULL,

```



```

y = NULL,

fill = NULL) +

xlab(NULL)+

ylab(NULL)+

theme_lab()+

theme(panel.grid.major.x = element_blank(),

legend.position = "right")

PC.AG <- prcomp(~. , data=AG, na.action=na.omit, center = TRUE,scale=TRUE)

summary(PC.AG)

data<-AG.clust

PCi<-data.frame(PC.AG$x,Grupo=AG.clust$AG.clusters)

PCi$Grupo <- as.factor(PCi$Grupo)

ggplot(PCi,aes(x=PC1,y=PC2,col=Grupo))+

geom_point(size=2,alpha=0.7)+ ylim(c(-6, 6)) + xlim(c(-6, 6))+#Size and alpha just for fun

scale_color_manual(values = c("darkgoldenrod1", "#008B00", "grey70", "darkmagenta"))+ #your colors here

theme_classic()

AG.grup <- AG.clusters

AG.grup <- AG.grup$AG.clusters

#ggbiplot(morfo.pca, ellipse=TRUE, var.axes = FALSE,

#labels=rownames(Morfo[-c(2:4,49),]), groups=morfo.grup)

autoplot(PC.AG, data= AG, ylim= c(-0.36,0.36), xlim= c(-0.36,0.36),loadings = TRUE,

loadings.colour = "grey70", labels.colour = "grey50",

loadings.label = TRUE, loadings.label.size = 2, labels=TRUE,

loadings.label.repel=TRUE)

autoplot(PC.AG, data = AG, label = TRUE, label.size = 3)

#análisis de correlación Proximal y AG

Prox.corr <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/Prox_mean.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

```

```

Prox.corr <- Prox.corr %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Genotipo")

#correlación

M <- cor(Prox.corr)

#color spectrums

col2 <- colorRampPalette(c("#67001F", "#B2182B", "#D6604D", "#F4A582", "#FDDBC7",
"#FFFFFF", "#D1E5F0", "#92C5DE", "#4393C3", "#2166AC", "#053061"))

#corr significance test

cor.mtest <- function(mat, conf.level = 0.95){

  mat <- as.matrix(mat)

  n <- ncol(mat)

  p.mat <- lowCI.mat <- uppCI.mat <- matrix(NA, n, n)

  diag(p.mat) <- 0

  diag(lowCI.mat) <- diag(uppCI.mat) <- 1

  for(i in 1:(n-1)){

    for(j in (i+1):n){

      tmp <- cor.test(mat[,i], mat[,j], conf.level = conf.level)

      p.mat[i,j] <- p.mat[j,i] <- tmp$p.value

      lowCI.mat[i,j] <- lowCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[1]

      uppCI.mat[i,j] <- uppCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[2]

    }

  }

  return(list(p.mat, lowCI.mat, uppCI.mat))

}

res1 <- cor.mtest(AG,0.95)

## leave blank on no significant coefficient

corrplot(M, p.mat = res1[[1]], diag = FALSE,insig = "blank", type="lower",

  method = "color", order = "original", col= col2(50), cl.cex = 0.5,

  tl.cex = 0.6, tl.col = "grey32", tl.srt = 45)

dev.off()

```

```

png("num_corr.png", width = 680,height = 650)

corrplot(M, p.mat = res1[[1]],insig = "blank", type="lower", method = "number",

order = "hclust", col = "grey30",

number.cex = 0.5, diag= FALSE,

cl.pos = "n", tl.cex = 0.6, tl.col = "grey32", tl.srt = 45)

dev.off()

plot(fit)

104-15

AOvsNormal <- c(2,87)

dim(AOvsNormal) <- c(2,1)

chisq.test(AOvsNormal, p=c(1/16,15/16))

33+37+29

GenAOvsWT <- c(2,3,99)

dim(GenAOvsWT) <- c(3,1)

chisq.test(GenAOvsWT, p=c(1/16,1/16,14/16))

#Análisis regresión AhFAD2 y O/L

AG.corr <- read.table("/home/francisco/Documents/SNPs_RILs/Química/Geno_AG_TP.csv",

sep = ",", na.strings = NA, dec = ".", header = TRUE)

AG.corr <- AG.corr %>% remove_rownames %>% column_to_rownames(var="Muestra")

ggplotRegression <- function (fit) {

require(ggplot2)

ggplot(fit$model, aes_string(x = names(fit$model)[2], y = names(fit$model)[1])) +

geom_point() +

stat_smooth(method = "lm", col = "darkgreen") + ylab ("Oléico 18:1") +

labs(title = paste("Adj R2 = ",signif(summary(fit)$adj.r.squared, 5),

"Intercept =",signif(fit$coef[[1]],5 ),

" Slope =",signif(fit$coef[[2]], 5),

```

```

" P =",signif(summary(fit)$coef[2,4], 5)), ylab("Oléico 18:1"))
}

ggplotRegression(lm(Oleico_18.1 ~ Recodificación, data = AG.corr))

fit <- lm(Oleico_18.1 ~ Recodificación + Madurez , data = AG.corr)

summary(fit)

M <- cor(AG.corr[-1])

#color spectrums

col2 <- colorRampPalette(c("#67001F", "#B2182B", "#D6604D", "#F4A582", "#FDDBC7",
"#FFFFFF", "#D1E5F0", "#92C5DE", "#4393C3", "#2166AC", "#053061"))

#corr significance test

cor.mtest <- function(mat, conf.level = 0.95){

mat <- as.matrix(mat)

n <- ncol(mat)

p.mat <- lowCI.mat <- uppCI.mat <- matrix(NA, n, n)

diag(p.mat) <- 0

diag(lowCI.mat) <- diag(uppCI.mat) <- 1

for(i in 1:(n-1)){

for(j in (i+1):n){

tmp <- cor.test(mat[i,], mat[j], conf.level = conf.level)

p.mat[i,j] <- p.mat[j,i] <- tmp$p.value

lowCI.mat[i,j] <- lowCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[1]

uppCI.mat[i,j] <- uppCI.mat[j,i] <- tmp$conf.int[2]

}

}

return(list(p.mat, lowCI.mat, uppCI.mat))

}

res1 <- cor.mtest(AG.corr,0.95)

## leave blank on NO significant coefficient

corrplot(M, p.mat = res1[[1]], diag = TRUE, insig = "n", type="lower",

```

```
method = "number", order = "original", col= col2(50), cl.cex = 0.5,
tl.cex = 0.6, tl.col = "grey32", tl.srt = 45)

library(Hmisc)

describe(AG.corr)

hist(AG.corr$Oleico_18.1, ylab = "Frecuencia", col = "#FFD700",
xlab = "Contenido de ac. Oléico",main = "Histograma del contenido de ac. Oléico")

mean(AG.corr$Oleico_18.1)

sd(AG.corr$Oleico_18.1)

range(AG.corr$Oleico_18.1)

hist(AG.corr$Madurez, ylab = "Frecuencia", col = "#458B00",
xlab = "Madurez",main = "Histograma de la madurez")

mean(AG.corr$Madurez)

sd(AG.corr$Madurez)

range(AG.corr$Madurez)

hist(AG.corr$Recodificación, ylab = "Frecuencia", col = "#483D8B",
xlab = "Genotipo recodificado",main = "Histograma de los genotipos")

#END
```