

Tesis de Posgrado

Caracterización y diferenciación de Germoplasma de Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) mediante marcadores moleculares

Giancola, Sandra M.

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giancola, Sandra M.. (1998). Caracterización y diferenciación de Germoplasma de Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) mediante marcadores moleculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3059_Giancola.pdf

Cita tipo Chicago:

Giancola, Sandra M.. "Caracterización y diferenciación de Germoplasma de Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) mediante marcadores moleculares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3059_Giancola.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**CARACTERIZACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN DE GERMOPLASMA
DE SOJA**
**(*Glycine max* (L.) Merr.) MEDIANTE
MARCADORES MOLECULARES**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas.

Lic. en Ciencias Biológicas Sandra M. Giancola

Director: Dr. Horacio Esteban Hopp

1998

Instituto de Biotecnología, CICV, INTA-Castelar
Instituto Nacional de Semillas (INASE)

30599

Pensar en los agradecimientos resulta fácil pues están en nuestra mente y alma. Pero resulta difícil, cuando uno desea expresar por escrito todo lo que se siente y todo aquello que durante tanto tiempo formó parte de una vida plena e inolvidable.

Cuando uno empieza todo es ilusión, nos sentimos pequeños ante aquellas personas llenas de experiencia, pero el apoyo, la dedicación y comprensión de todos los que me acompañaron, me ayudaron a tener la suficiente fuerza para seguir adelante, sobrepasando todos los momentos difíciles y aprendiendo a cada momento de las grandes y pequeñas cosas...

A mi Director de tesis, Dr. Esteban Hopp.
Necesito decirle al profesor de la facultad, que hace tiempo atrás, cuando tanto aprendía de vos, soñaba que si algún día llegaba a estas instancias, fueras mi director de tesis. Hoy puedo corroborar que los sueños se hacen realidad. Gracias por todo lo recibido, por lo que se percibe y por lo que a través del tiempo se siente.

A mi Codirector de tesis, Dr. Jorge Dubcovsky.
Intento encontrar palabras que gratifiquen mi sentir, todas son nobles y plenas de gratitud. Orientador de mi proyecto, esfuerzo, guía, comprensión, búsqueda incesante y algo muy difícil de lograr, continuidad plena de entusiasmo. Mi mayor gratitud.

Ing. Adelaida Harries, Presidente del INASE.
Suele ser difícil encontrar seres que se brinden tan plenamente, puros, sin egoísmo, haciéndome sentir feliz frente a mi búsqueda, sin jamás poner un escollo y brindándome todo lo necesario para llegar a este momento. Qué suerte habernos cruzado en el camino de la vida, pues nadie logra sólo, aquello que no es valorado por otros. A un ser muy especial, lo mejor de mí.

Lic. Mónica Pequeño Araujo.
Hay seres que superan la realidad, éste es mi sentir por vos. Siempre dispuesta a dar y darse, ¡cuánta nobleza!. Actitudes así guían hacia senderos de superación permanente e incesantemente. Todo esto y mucho más lo he recibido y valorado plenamente. Mi gratitud.

Ing. Raimundo Lavignole e Ing. Ulises Mitidieri.

De Uds. he recibido orientación plena, guía absoluta de la observación de la planta en su medio ambiente. Me enseñaron a palparla, sintiendo que cada una es diferente e irremplazable. Así siempre, permanecerán en mí.

Al grupo humano del EEA Marcos Juárez.

Lo que se brinda con amor también se recibe de igual forma. Los tengo presentes a cada uno de Ustedes, dándose al brindarme tantos conocimientos. En parte de este trabajo, se ha volcado sus enseñanzas. Los valoro plenamente.

Ing. Mónica Inés Moreno.

Agradezco aquel día, no sé cuál, ni cuando..., comenzamos a transitar el camino juntas, el cual logró una valoración que había pasado desapercibida. Guardo ese momento como un logro hermoso y pleno de gratitud.

Dra. Laura Giorda.

De tu personalidad tan noble y abierta frente a cada consulta que te hiciera, siempre recibí de vos lo mejor. ¡Gracias!.

A mis amigos del INTA.

Gracias a todos Uds. que juntos nos relacionamos a través de lo más hermoso que tiene el hombre, realizar el trabajo que ama. Hoy los recuerdo con lo simple y bello que tiene el compartir y en el compartir, las vivencias que perdurarán. ¡Gracias por conocerlos!.

A mis amigos del INASE.

Todo esto nos unió formando un grupo del cual son parte mía. Me siento feliz de haber permanecido juntos. Recordaré siempre de cada uno de Uds. su personalidad, la cual forma parte de mí. Los valoro plenamente.

Gus.

No es común recibir manos plenas, conocimientos adquiridos, ideas logradas, búsquedas para brindarlas, preocupación e interés pleno. Es por ello que en un momento tan especial de mi vida, necesito transmitirte eso que se llama, "amistad".

A mis amados padres.

No puedo dejar de mencionar a los seres incondicionales, a aquellos que siempre están y que por la búsqueda de nuevos logros he perdido momentos para disfrutarlos. ¡Pero quien puede comprender mejor que los padres!

A Uds. les dedico esta tesis, con el amor más profundo que un hijo puede tener. Los llevo en el corazón, nuevamente gracias.

A mi querida hermana Silvana.

Gracias por estar siempre a mi lado.

Bernard...

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)	4
RESUMEN.	6
INTRODUCCION	8
1. LA SOJA EN LA ARGENTINA, SU HISTORIA E IMPORTANCIA AGROECONÓMICA	8
2. SISTEMA DE PROTECCION Y CONTROL DE SEMILLAS EN ARGENTINA	17
3. ORIGEN Y ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENETICA	20
4. MARCADORES MOLECULARES	21
5. MARCADORES MOLECULARES VERSUS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, FISIOLÓGICAS Y FENOLOGICAS, EN LA CARACTERIZACION Y DIFERENCIACION VARIETAL	31
6. MARCO Y OBJETIVOS DEL PROYECTO DE TESIS	37
MATERIALES Y METODOS	40
1. MATERIAL GENETICO	40
2. ANALISIS DE CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	47
2.1 Tipo de crecimiento de la planta	51
2.2 Tipo de planta	52
2.3 Color de pubescencia	53
2.4 Forma del folíolo	54
2.5 Color de flor	55
2.6 Reacción al test de peroxidasa	55
2.7 Color del hilo de la semilla	57
2.8 Grupo de maduración	58
2.9 Color de Vaina	59
2.10 Tonalidad del fruto	60
2.11 Color de la hoja	60
2.12 Color del hipocótilo	61
2.13 Tono de pubescencia	61
2.14 Brillo del tegumento	62
2.15 Forma de la semilla	62

2.16	Peso de 1000 semillas	63
3.	EXTRACCION DE ADN	64
4.	ANALISIS DE RAPD	67
4.1	Determinación de “primers” informativos	67
4.2	Análisis con marcadores RAPD seleccionados	69
5.	ANALISIS DE AFLP	69
5.1	Digestión-Ligación	70
5.2	Amplificaciones	71
5.2.1	Pre-amplificación	72
5.2.2	Amplificación selectiva	73
5.3	Análisis en geles de poliacrilamida	74
5.4	Revelación con nitrato de plata	74
6.	ANALISIS DE MICROSATELITES O SIMPLES SECUECNIAS REPETITIVAS (SSR)	76
6.1	Microsatélites analizados	76
6.2	Amplificaciones	78
6.3	Análisis de poliacrilamida	79
6.4	Revelación con nitrato de plata	80
7.	ANALISIS DE DATOS	81
7.1	Obtención del “documento único de identidad genético	82
7.2	Análisis multivariado	82
7.2.1	Análisis de datos de los perfiles	83
7.2.2	Cálculo de distancias genéticas	88
7.2.3	Relación genética por análisis de dendrograma	89
RESULTADOS		92
1.	ANALISIS Y CUANTIFICACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA EN SOJA BASANDOSE EN LA COMPARACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS TRADICIONALES	92
2.	ANALISIS Y CUANTIFICACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA EN SOJA BASANDOSE EN MARCADORES MOLECULARES	103
2.1	Obtención del “documento de identidad” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de RAPD	103

2.1.1 Determinación de “primers” informativos	103
2.1.2 “Documento de identidad genético” de 100 variedades de soja con propiedad en Argentina, determinado por RAPD	111
2.2 Obtención del “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de AFLP	120
2.3 Obtención del “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de SSR	133
3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA	170
3.1 Eficiencia de los marcadores moleculares para detectar polimorfismos y variación genética (índices polimórficos)	170
3.2 Relación genética entre variedades de soja	172
3.2.1 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. RAPD	181
3.2.2 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. AFLP	185
3.2.3 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. SSR	189
3.2.4 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. marcadores moleculares purificados (MMP)	194
3.2.5 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. características morfológicas + SSR	199
DISCUSION	205
1. ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	205
2. COMPARACION DE TODOS LOS SISTEMAS UTILIZADOS (CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, SSR, RAPD, AFLP Y SUS COMBINACIONES)	209
CONCLUSIONES, CONSECUENCIAS Y PERSPECTIVAS	252
REFERENCIAS	261

ABREVIATURAS

Abreviaturas para marcadores moleculares

AFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados

RAPD: ADN Polimórfico Amplificado al Azar

RFLP: Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción

Otras abreviaturas

ASSINSEL: Asociación Internacional de Seleccionadoras para la
Protección de la Obtención Vegetal

BMT: Técnicas biomoleculares

BrEt: Bromuro de Etidio

CM: centiMorgan

cm²: centímetro cuadrado

CTAB: *cetyl methylammonium bromide*

bd: bidestilada

dNTP: desoxirribonucleósido trifosfato

DHE: Distinguibilidad, Homogeneidad y Estabilidad

DO: densidad óptica

EDTA: *disodiumethylene diamine tetra-acetato*

EUA: Estados Unidos de Norteamérica

EtBr: bromuro de etidio

g: gramo

GM: Grupo de Madurez

h: hora

ha: hectárea

ISTA: International Seed Testing Association

kb:kilobases

kg: kilogramo

l: litro

MBD: Matriz basica de Datos

mg: miligramo

min: minuto

mM: milimolar

MMP: Marcadores Moleculares Purificados

Nº: número

ng: nanogramo

nm: nanometro

nt: nucleótido

OTUs: Unidad Taxonómica Oficial

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

pb: pares de bases

PBS: buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PI: *plant introduction number*

PIC: Índice de Contenido Polimórfico

RL: Restricción-Ligación

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundo

S/P: sin propiedad

TAE: buffer de electroforesis Tris-acetato/EDTA

TBE: buffer de electroforesis Tris-borato/EDTA

tn: tonelada

U: unidades enzimáticas

UPOV: Unión Internacional para la Protección de Obtenciones
Vegetales

μl: microlitro

UV: ultravioleta

V: volt

W: watt

CHARACTERIZATION AND DIFERENCIATION OF SOYBEAN GERMPLASM (*Glycine max* (L.) Merr) WITH MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT

Soybean is a self pollinating species of limited genetic variability. This variability is further reduced in soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merr.) due to the fact that they are usually derived from crosses among members of an elite group of genetically related parents. This limited variability is sometimes insufficient to unambiguously identify new cultivars.

The aim of this work is to test the feasibility of using different molecular markers such as “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD), “Amplified Fragments Length Polymorphism” (AFLP) and Microsatellite or Simple-Sequence-Repeat (SSR) to characterize and differentiate a set of 100 soybean varieties registered at the National Register of Cultivars of the National Seed Institute of Argentina (INASE, Secretariat of Agriculture, Livestock, Fisheries and Food). Sixteen known basic morphological, physiological and phenological traits were also recorded for each variety in order to compare the relationships among varieties derived from molecular markers.

The calculated variability indexes showed to be highly dependent on the specific technique used for the analysis ranging from 0.262 for SSR analysis, 0.401 for RAPD and AFLP analysis and 0.574 for morphological traits analysis. In total 109 polymorphic genomic loci were scored revealing a lower genetic variability when compared with published data of other species. The varieties were grouped by cluster analysis and the relationships derived from these cluster analysis was compared with known pedigree data of the registered varieties. The SSR data showed the best fit to pedigree data while maintaining an acceptable correlation to morphologically-based separation. AFLP showed a high multiplexity but low percentage of polymorphic bands while RAPD was low in multiplexity but with a better level of polymorphism.

A genetic fingerprint was established for each one of the 100 varieties and a minimum genetic distance for distinctness definition within UPOV concept could be defined.

RESUMEN

La soja es una especie autopolinizante de escasa variabilidad genética. Esta variabilidad se ve aún más reducida en variedades cultivadas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) debido a que en los programas de mejoramiento, usualmente se utilizan los mismos ancestros. Debido a esta escasa variabilidad genética es que resulta difícil la identificación y diferenciación de nuevos cultivares.

El objetivo de este trabajo fue testear la capacidad que tienen los diferentes marcadores moleculares tales como, RAPD (amplificación azarosa de ADN polimórfico), AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y Microsatélites o SSR (secuencias repetitivas simples), para caracterizar y diferenciar un conjunto de 100 variedades de soja registradas en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE), perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Fueron utilizadas 16 características morfológicas, fisiológicas y fenológicas para comparar la relación genética obtenida con los marcadores moleculares.

Se analizaron 424 *loci* genómicos polimórficos entre marcadores moleculares y morfológicos mostrando un porcentaje global de polimorfismo del 25.7% confirmando la baja variabilidad genética relativa de la soja comparada con otros cultivos y explicada por la estrecha base genética con que se maneja el mejoramiento de esta planta

La variabilidad evidenciada por cada uno de los sistemas de marcadores fue diferente. Las variedades fueron agrupadas por el sistema de “cluster analysis” y los resultados comparados con los datos genealógicos de las variedades registradas, concluyéndose que los microsatélites son los marcadores que mejor reflejan la evolución genómica de las variedades y mejor se correlacionan con la diferenciación morfológica. Los AFLP mostraron un alto rango de multiplex, pero bajo polimorfismo, en cambio los RAPD mostraron un valor intermedio de polimorfismo y bajo rango de multiplex.

Se logró establecer una “huella digital genética” para cada variedad y realizar un estudio de variabilidad genética, estimando la distancia mínima a considerar para la obtención de la propiedad.



INTRODUCCION

1. LA SOJA EN LA ARGENTINA, SU HISTORIA E IMPORTANCIA AGROECONÓMICA

La soja (*Glycine max* (L.) Merr. (2n=40)), es una planta anual perteneciente a la familia de las Leguminosas, originaria de China y otros países del este y sudeste asiático. Se la cultiva comercialmente debido a que produce un grano con alto contenido de proteína y aceite, razón por la cual se difundió ampliamente en el ámbito mundial.

La harina de soja es un alimento rico en proteínas de alto valor biológico, con características fisico-químicas semejantes a la caseína de la leche. Estas proteínas que son albúminas y globulinas, se encuentran en sitios de almacenamiento denominadas cuerpos proteicos o granos de aleurona y concentran aproximadamente el 65 a 80% de la proteína de la semilla (Irazoqui *et al*, 1996; Maggio *et al*, 1996; Maggio *et al*, 1996).

La calidad del aceite está relacionada con las proporciones de los distintos ácidos grasos que posee. El aceite contiene básicamente cinco ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico).

Existen genotipos que permiten obtener un aceite de calidad similar al de girasol “alto oleico”, con alta estabilidad y que seguramente constituirán el modelo hacia el cual evolucionarán los cultivares de soja en el futuro (Olivier, 1996).

El género *Glycine* Willd se divide en dos subgéneros, *Soja* y *Glycine*. El subgénero *Soja* (Moench.) F. J. Herm., incluye la especie cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) y su antecesor silvestre anual (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). Ambas son diploides ($2n=40$) y presentan homología cromosómica, que les permite cruzarse artificialmente con facilidad, obteniéndose híbridos fértiles.

El subgénero *Glycine* incluye a la soja silvestre perenne y cuenta con 12 especies descritas, aunque existen otras tres que están siendo clasificadas. Diez de las especies descritas son diploides ($2n=40$) y originarias de Australia. Las dos restantes son originarias de áreas más diversas y ambas poseen variantes tetraploides ($2n=80$) (Hymowitz *et al*, 1988; Singh *et al*, 1985; Singh *et al*, 1994).

La soja es nativa del este asiático. Varios autores sugieren que es originaria del norte y centro de China, donde fue domesticada, probablemente en el siglo XI AC. Su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra chino-japonesa (1894-1895), época en que los japoneses comenzaron a importar tortas de aceite de soja para usarlas como fertilizante (Probst *et al.* , 1973).

Aunque los europeos se enteraron de la existencia de la soja en 1712, por los escritos de Engelbert Kaemfer, botánico alemán que conoció el cultivo mientras vivió en Japón (1691-1692), las primeras semillas, traídas de China, fueron plantadas en 1740 en París, en el “Jardín des Plantes”. Se trató de difundir este cultivo en Europa pero la producción no se extendió, posiblemente por problemas de manejo y pobres condiciones climáticas.

Cerca de 1908 la especie atrajo atención en el mundo. En América fue introducida en Georgia (EUA) en 1765, desde China vía Londres y, posteriormente, en 1851, a Illinois (EUA), desde donde se multiplicó y diseminó. Se inició la gran expansión del cultivo en los EUA a partir de la década del 40, liderando la producción mundial de soja a partir de 1954.

En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó en la década del 40 (Fundação Cargill, 1983). A partir de 1973 se verificó un gran aumento de la producción comercial, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja (Bolsa de Cereales, 1964-1996; Bolsa de Cereales, 1971).

En la Argentina se realizaron distintos intentos para arraigar este cultivo, tanto a través de la actividad oficial como privada, aunque ésta última jugó un papel fundamental en la implantación definitiva del cultivo, en sus inicios. Las primeras plantaciones en el país se hicieron en 1862, pero no encontraron eco en el campo argentino de aquellos años (Piquín, 1968; Zeni, 1971). Luego de varios comienzos por incorporar el cultivo en la Argentina, en 1956 la empresa privada Brandt Laboratorios SA fundó una filial llamada Agrosoja SRL y, simultáneamente, realizó un convenio de investigación agrícola con el organismo oficial específico, la Dirección General de Investigaciones Agrícolas (dependiente del Ministerio de Agricultura de la Nación), organismo precursor del INTA.

En la década del 60 por el esfuerzo de unos pocos investigadores, se logró su implantación definitiva. Se incrementó en los años 70, hasta convertir a la Argentina en el tercer productor mundial de grano, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja. Como consecuencia, la soja es el producto de exportación de mayor incidencia en el Sector Agropecuario del país y el mayor generador de divisas.

La soja es una especie altamente autógena. Tiene flores perfectas con órganos femeninos y masculinos envueltos dentro de la corola. Los insectos pueden llevar el polen, aunque la frecuencia de polinización cruzada es menor al 1%. Por tal motivo no es necesario controlar la polinización en los campos experimentales de mejoramiento, ya que la contaminación por cruzamiento natural es un hecho extremadamente raro.

El fenotipo de un individuo está determinado por su genotipo y la influencia que el ambiente ejerce sobre el mismo. Por ello es importante determinar, dentro del valor fenotípico, la componente que corresponde a los efectos genéticos y los ambientales.

Los caracteres de la planta generalmente se clasifican, como de herencia **cualitativa** o **cuantitativa**, dependiendo del número de genes que los controlan y la importancia del ambiente en la expresión de estos genes.

Los caracteres de herencia **cualitativa** son controlados por uno o unos pocos genes mayores, cuya expresión no está marcadamente influenciada por el ambiente.

Diversos autores (Bernard *et al.* , 1973; Palmer *et al.* , 1987), realizaron una completa revisión de la genética cualitativa, detallando los genes conocidos y el tipo de herencia de un gran número de caracteres, por ej. color de flor, color de pubescencia, vaina, tegumento, forma del folíolo, actividad de peroxidasa.

Fundamentalmente tienen utilidad desde el punto de vista descriptivo de un cultivar y otros poseen importancia agronómica en el cultivo, debido a que inciden en la productividad, adaptación y calidad del producto (por ejemplo: tipo de crecimiento del tallo, resistencia a determinadas enfermedades, etc.)

Los caracteres de herencia **cuantitativa** presentan una distribución continua de los fenotipos. La variabilidad está asociada con la segregación de varios *loci* llamados QTL (*loci* para caracteres cuantitativos) y se hallan fuertemente influenciados por el medio ambiente.

Diversos investigadores (Barry *et al.* , 1992; Burton *et al.* , 1987), realizaron una revisión completa de la herencia cuantitativa en soja. Corresponden a este tipo de herencia caracteres económicos muy importantes, tales como el rendimiento, el ciclo a floración y madurez y los tenores de aceite y proteína de la semilla.

Con respecto al tipo de herencia del ciclo a floración y madurez en soja, es considerada por muchos mejoradores una herencia de tipo cuantitativa y estos caracteres se expresan marcadamente en función de la temperatura y el fotoperíodo. Por lo tanto, las características ambientales determinan el rango de grupo de madurez (GM) y los cultivares de cada GM que mejor se adaptan a cada región y lote. El comportamiento previo de los cultivares en cada lote integra las características ambientales locales.

Su conocimiento resulta muy valioso en el momento de decidir la incorporación de un nuevo cultivar a la producción. Dicha información orienta sobre las características principales que deben reunir los nuevos cultivares a utilizar. Debido a la respuesta fotoperiódica de la soja, los cambios en latitud modifican la longitud del ciclo de cada cultivar.

En consecuencia, existe un rango de GM adaptados a cada región que se comportarán como de ciclo corto, medio o largo. Cada cultivar cuenta con una franja latitudinal en la cual con fechas de siembra del mes de noviembre se comportan como de ciclo medio, al norte como ciclo corto y al sur como ciclo largo. El número de GM utilizado aumenta de sur a norte del país, con el incremento de los días libres de helada. Por ejemplo en la provincia del Chaco se recomienda anticipos de la fecha de siembra entre mediados de septiembre y octubre con cultivares de GM IV y V. Lo expresado se representa en la **Figura 1**.

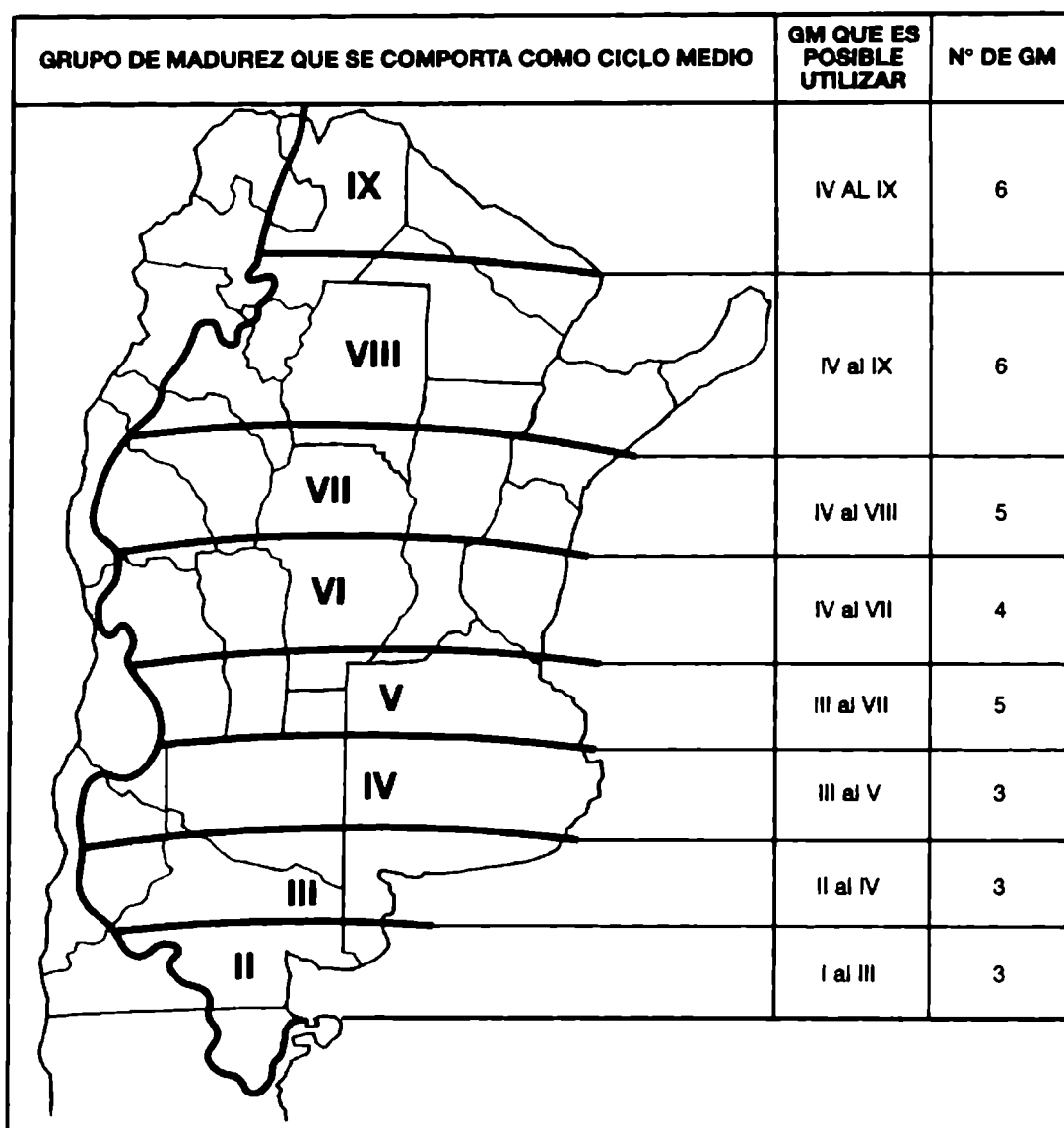


Fig. 1: Franjas latitudinales de adaptación de los grupos de maduración de soja en la Argentina.

El Cultivo de soja se inició en nuestro país con la introducción, fundamentalmente, de cultivares norteamericanos y, en menor medida, brasileños. Entre ellos se destacaron algunos como, “Hood”, “Hood 75”, “Forrest”, “Williams” y “Bragg”, que tuvieron una gran adaptación y permanecieron arraigados entre los productores, durante muchos años.

Los trabajos de mejoramiento genético en el país, fueron puestos en marcha hace aproximadamente veinte años.

Johnson y Bernard (Johnson *et al.* ,1963), describen un esquema de selección para el desarrollo varietal basado en el método de pedigrí (está basada en el comportamiento de la progenie, permitiendo aumentar la capacidad de los mejorados), que tiene en cuenta la heredabilidad de los diversos caracteres de importancia económica en la soja.

Se basa fundamentalmente en el cruzamiento de dos variedades, obtención de un híbrido y posteriores autofecundaciones. De acuerdo a dicho esquema, en las primeras generaciones debería ponerse énfasis en la identificación de plantas de una altura apropiada, ciclo adaptado a las condiciones regionales, calidad de semilla, resistencia al desgrane y a ciertas enfermedades. Según dichos autores, a partir de las generaciones F4 o F5 (ya con un importante grado de fijación de homocigosis) podría hacerse selección por rendimiento y vuelco en parcelas.

En la década del 80, empresas privadas e instituciones oficiales aportaron los primeros cultivares nacionales, entre ellos “Asgrow 5308”, “OFPEC Rendidora”, “Torcaza 63”, “Federada 1 INTA” y “Norking 641”.

El lanzamiento de nuevos cultivares, particularmente de los grupos IV a VII, fue creciendo a lo largo de estos años. En esta campaña el número de cultivares inscriptos en la plaza comercial superan las 100 entradas (Giorda *et al.*, 1997).

2. SISTEMA DE PROTECCIÓN Y CONTROL DE SEMILLAS EN LA ARGENTINA

El contenido genético de cada semilla representa un gran esfuerzo de investigadores y de programas de mejoramiento, por otro lado el gran crecimiento de la producción de semillas y las demandas del mercado, llevan a la creación de la ley de las mismas.

El organismo responsable de la aplicación de la ley de semillas N° 20.247, es el Instituto Nacional de Semillas (INASE), cuyo principal blanco es proveer un cuadro legal y técnico.

Dentro de esta Institución se crea la Lista Nacional de Cultivares, donde se encuentran todas las variedades que se comercializan en el país y la Lista Nacional de Propiedad de Cultivares, en la cual se encuentran todas las variedades protegidas, significa que una nueva variedad puede ser protegida, otorgando un título de propiedad. Esta función está destinada al Registro Nacional de Cultivares del INASE.

Por la ley N° 24.736/94 establecida por el Congreso de la Nación Argentina, acepta la adherencia de nuestro país a la Convención Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV).

Esto permite aumentar la confianza nacional como internacional en el ámbito de otorgamiento de propiedad a las nuevas variedades creadas.

Para que una nueva variedad pueda adquirir su título de propiedad, debe cumplir con el artículo 6 de la Convención de UPOV (TG/1/2, 1979), donde se estipulan tres requisitos:

1. **Distinguibilidad** (una nueva variedad, debe demostrar ser distinta sobre la base de un carácter importante a las ya existentes en el Listado Nacional de Propiedad de cultivares).

2. **Homogeneidad** (todas las plantas de una misma variedad, deben presentar los mismos caracteres morfológicos, fisiológico y/o fenológicos, tomando en cuenta su sistema de reproducción).
3. **Estabilidad** (todas las plantas de una misma variedad, deben ser estables en sus características esenciales, luego de repetidas multiplicaciones o reproducciones).

Hoy en día los estudios de Distinguibilidad, Homogeneidad y Estabilidad se realizan a campo, siguiendo las directrices (DHE), para cada especie. Son seguidos por todos los países adherentes a UPOV, con el fin de lograr coherencia en los resultados.

Para cada especie existen ciertas características a ser analizadas, cumpliendo requisitos sobre el modo de siembra y el momento de observación de cada una de ellas.

Pero no resulta lo mismo realizar un estudio de **identificación o caracterización**. Con variedades a las que ya se les ha otorgado su propiedad (o sea que forman parte del Listado de Propiedad de Cultivares) se busca lograr una descripción que permita reconocer dentro de la totalidad de variedades a la variedad considerada.

En la actualidad el sistema que se utiliza es el morfológico y como sistemas complementarios al mismo, la utilización de técnicas bioquímicas tradicionales (electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas de reserva e isoenzimas) ya estandarizadas por el

Organismo Internacional de Testeo de Semillas (ISTA), en el cual la Argentina tiene representantes en el Comité Ejecutivo de la Organización mencionada.

Este tipo de tecnologías presenta el inconveniente de no evidenciar un alto grado de polimorfismo, fundamentalmente en especies cuyas variedades están muy relacionadas genéticamente como es el caso de la soja.

3. ORIGEN Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Dentro de una especie, las plantas individuales difieren en el ámbito de su ADN debido a mutaciones. Existen diferentes clases de mutaciones incluyendo: sustitución de bases, inserciones, inversiones y deleciones. Las sustituciones de bases pueden ser causadas por errores durante la replicación del ADN o por mutágenos ambientales (ej. : radiación UV). Las inserciones/deleciones son con frecuencia causadas por transposones, por entrecruzamientos desiguales o por deslizamientos de la ADN polimerasa durante la replicación de ADN con “motivos” repetitivos.

Dado que los genes comprenden una porción pequeña del ADN total y están bajo una fuerte presión de selección negativa para los cambios, la mayoría de las modificaciones que diferencian a los individuos en el ámbito de su ADN ocurren en la porción no codificante del mismo.

4. MARCADORES MOLECULARES

En el pasado no era posible estudiar la variación en el ámbito de ADN en plantas de una manera sistemática. El desarrollo de las técnicas empleadas actualmente en Biología Molecular permite a genetistas y mejoradores estudiar las variaciones de ADN en plantas, aún en las zonas más variables y no codificantes del genoma. Las herramientas utilizadas para el estudio de variaciones en el ADN son consideradas como marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares utilizan una variedad de técnicas tales como: digestión con endonucleasas de restricción, amplificación de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y electroforesis en geles. La capacidad de cada tipo de marcador para detectar variaciones en el ámbito de la secuencia del ADN varía de acuerdo a características inherentes a los métodos usados para detectar cada uno de ellos.

Los progresos en el mejoramiento de plantas dependen de la variabilidad genética disponible. Para poder mantener y utilizar efectivamente las colecciones de germoplasma, es importante lograr medir el nivel de mutaciones nuevas presentes en los diferentes ejemplares que comprende la colección.

Los marcadores moleculares permiten obtener una medida cuantitativa de la variabilidad genética de una colección de germoplasma. Con esta información (así como información agronómica e histórica) es posible:

- 1) Identificar material duplicado en la colección.
- 2) Establecer una colección de referencia.
- 3) Determinar los grados de similitud entre especies cultivadas y salvajes.
- 4) Establecer prioridad para la adición de material nuevo a una colección.

Existen antecedentes sobre la utilización de distintos tipos de marcadores moleculares, principalmente en el estudio de la variabilidad entre distintas especies o bien un número reducido de individuos de una misma especie, pero poca información sobre el estudio en variedades protegidas cuya historia demuestra alta relación genética, involucrando dificultades para su caracterización y diferenciación.

La utilización de los marcadores moleculares como técnica de identificación de genotipos es ampliamente utilizada en la medicina forense humana (Easteal *et al.* , 1991) y en los registros de animales de razas (bovinos, equinos, porcinos y ovinos), en los países desarrollados.

Recientemente se han descrito en trigo (Roder *et al.* , 1995; Devos *et al.* , 1995), soja (Akkaya *et al.* , 1992; Rongwen *et al.* , 1995; Yanagisawa *et al.* , 1994; Maughan *et al.* , 1995; Powell *et al.* , 1996), girasol (Brunel, 1994), maíz (Senior y Heun, 1993), tomate (Broun *et al.* , 1996) y otras especies, un nuevo tipo de marcadores moleculares basados en la amplificación por PCR de zonas hipervariables del genoma, los microsatélites (SSR, secuencias simples de repetición).

Una segunda generación de marcadores, RAPD (amplificación azarosa de ADN) basadas también en la amplificación por PCR, utiliza “primers” aleatorios para detectar polimorfismos entre los distintos genomas (Williams *et al.* , 1990; Welsh *et al.* , 1990).

La tercera generación de marcadores, AFLP (longitud de fragmentos polimórficos amplificados) desarrollada por Keygene (Vos *et al.* , 1995), que permite analizar numerosos *loci* simultáneamente en geles de secuenciación nucleotídica.

Por lo tanto, los marcadores moleculares constituyen uno de los principales aportes de la biología molecular a la genética vegetal.

En esta tesis, nos basamos principalmente en la utilización de marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN, representados principalmente por tres técnicas:

- a) **RAPD** (amplificación azarosa de ADN polimórfico, Williams *et al.* ,1990).
- b) **AFLP** (polimorfismo de longitud de fragmentos de amplificación, Vos *et al.* , 1995).
- c) **Microsatélites o SSR** (secuencias simples repetitivas, Akkaya *et al.* , 1992).

La técnica de **RAPD**, se basa en la utilización de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (**PCR**), un oligonucleótido (“primer”) actúa como iniciador para la ADN polimerasa a lo largo de todo el genoma a partir de los sitios donde se presentan secuencias complementarias. Cuando dos “primers” hibriden en hebras complementarias y a una distancia de entre 200 a 3000 pares de bases entre ellos, el fragmento comprendido entre las secuencias complementarias a los “primers” será amplificado.

El producto generado podrá visualizarse mediante una electroforesis en gel de agarosa. Si dos genotipos difieren en las secuencias complementarias a los “primers”, presentarán un **polimorfismo** entre ellos consistente en la presencia vs. ausencia de una o más bandas (**Figura 2**), (Williams *et al.* , 1990; Welsh y McClelland, 1990).

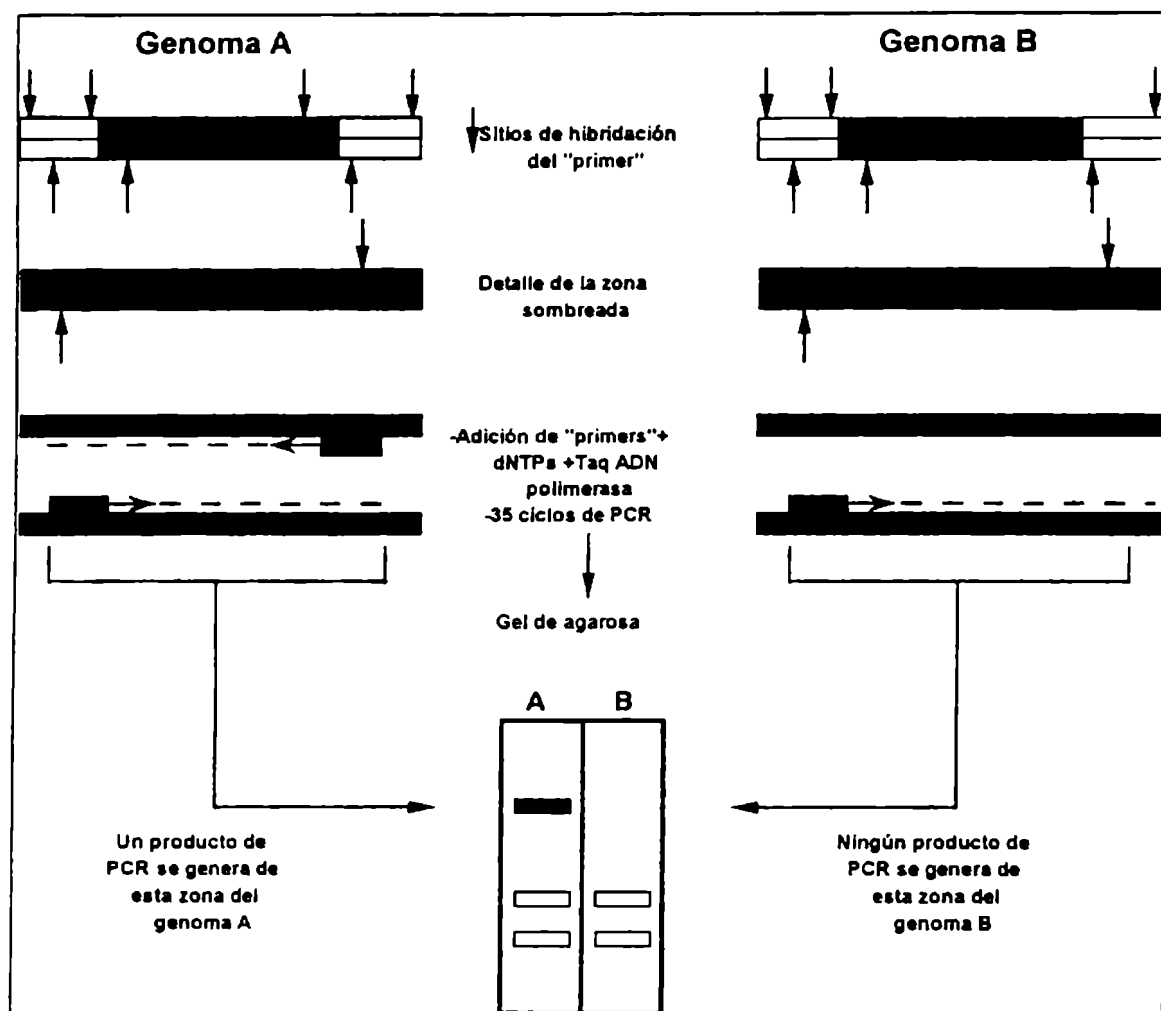


Fig. 2: Detección de polimorfismos mediante la técnica de RAPD.

Las ventajas de los RAPD son:

1. Los ensayos requieren una muy pequeña cantidad de ADN
2. Suelen ser eficientes en la detección de polimorfismos
3. No requieren una tecnología sofisticada para su realización

Las desventajas son:

1. Por ser marcadores de visualización dominante (por ejemplo: sólo se visualiza un alelo del *locus*, como presencia o ausencia de una banda)
2. La información de un *locus* no puede ser siempre extrapolada entre especies. Es decir, a medida que aumenta la distancia genética aumenta la probabilidad de que 2 bandas que comigran pertenezcan a 2 *loci* diferentes.
3. No son altamente reproducibles entre distintos laboratorios

La técnica de **AFLP** se basa en la detección de fragmentos genómicos de restricción mediante la técnica de PCR. La generación de AFLP consta de tres pasos:

- Digestión del ADN genómico y ligación de oligonucleótidos adaptadores
- Amplificación selectiva de los fragmentos digeridos por PCR
- Análisis de los fragmentos amplificados por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

La PCR de los fragmentos de restricción es llevada a cabo usando los adaptadores y los sitios de restricción como blanco de hibridación de los “primers”.

La amplificación selectiva se realiza usando “primers” que se extienden dentro del fragmento en los cuales existe homología con los nucleótidos que flanquean a los sitios de restricción.

Este método permite la co-amplificación de numerosos fragmentos de restricción. El número de fragmentos amplificados varía usualmente entre 40 y 100, aún en poblaciones con un bajo nivel de polimorfismo, se espera encontrar al menos 3-10 marcadores claramente identificables (**Figura 3**).

Las ventajas de los AFLP son:

1. No es necesario recurrir, como en los RAPD, a una selección inicial de “primers” polimórficos debido al gran número de *loci* ensayados simultáneamente.
2. Son muy reproducibles debido a la exigente temperatura de hibridación durante la PCR.

Las desventajas son:

1. Son marcadores de visualización dominante (igual que los RAPD)
2. Requieren una alta cantidad de ADN y una excelente calidad del mismo.

La técnica de **SSR**. Los microsatélites son regiones que contienen secuencias simples repetitivas que son amplificadas individualmente a través de PCR, utilizando un par de “primers” específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a secuencias únicas que flanquean al microsatélite.

Los segmentos amplificados a partir de estos sitios muestran un alto polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetitivos (“motivos”).

Así mismo, cada microsatélite, independientemente del elemento repetitivo (CA, TG, ATG, ATT, etc.), constituye un *locus* genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo.

Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas o centenas de pares de bases) representa un alelo diferente de un mismo *locus* (**Figura 4**).

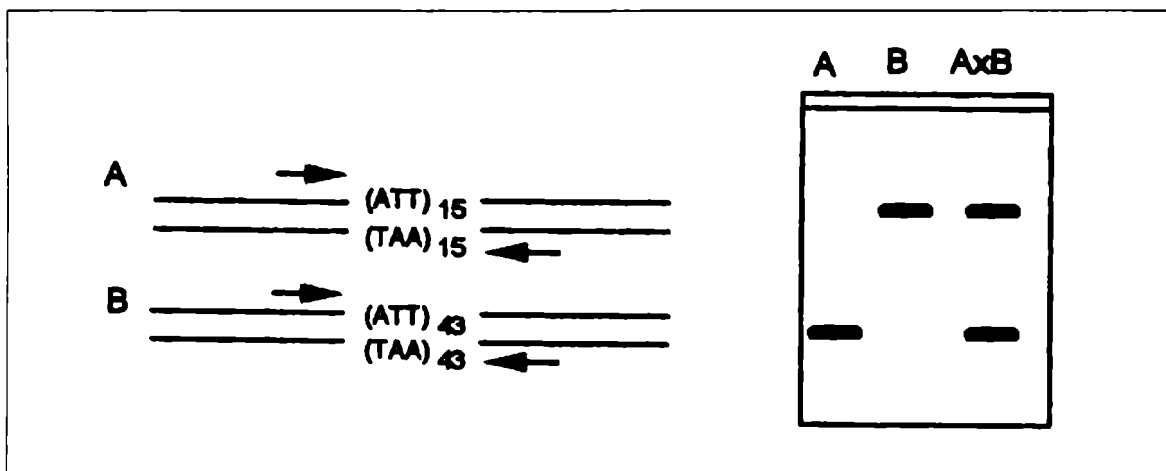


Fig.4: Representación esquemática de la obtención de polimorfismos mediante la técnica de SSR.

Las ventajas son:

1. Es una técnica de visualización co-dominante (permite observar los 2 alelos en el heterocigota), y multialélica mostrando una alta información polimórfica
2. Son altamente repetibles

Las desventajas son:

1. No se han desarrollado en todas las especies
2. El desarrollo de los microsatélites es altamente costoso

Debido a que cada uno de los sistemas de marcadores moleculares presentan ventajas y desventajas, la elección de uno u otro sistema dependerá de los objetivos particulares del proyecto de identificación y caracterización.

5. MARCADORES MOLECULARES VS. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS Y FENOLÓGICAS, EN LA CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN VARIETAL

Hoy en día la diferenciación de variedades se realiza en el cuadro de pruebas de Distinguibilidad, Homogeneidad y Estabilidad (DHE) que permiten la descripción fenotípica de las variedades. Éste sigue siendo el método disponible para diferenciar e identificar una variedad de otras, dentro de una colección.

En el Acta de 1991 del convenio de la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV), se da la definición de “variedad” (Artículo 1.VI), que establece claramente la base fenotípica para la descripción.

Definición de variedad:

- Está definida por la expresión de caracteres resultantes de un cierto genotipo o de la combinación de genotipos.
- Se distingue del resto del conjunto vegetal, por la expresión de al menos uno de los caracteres anteriormente mencionados.
- Se la considera como una entidad, con respecto a la capacidad que tiene de reproducirse idéntica a sí misma.

La distinción en la actualidad, se establece sobre la base de caracteres que tienen o no una relación con el valor agronómico o tecnológico de la variedad. Basta con una diferencia relativa a un carácter (calificado como “importante”) para llegar a la conclusión que hay distinción de una variedad en relación con otras (UPOV/QUI/96/15, 1996).

Toda diferencia entre organismos vivientes, está determinada por diferencias en las secuencias nucleotídicas del genoma, por lo tanto con la aparición de técnicas moleculares que permiten detectar esas diferencias, surge el interrogante que las mismas sean utilizadas, no sólo para identificar, sino también para diferenciar variedades.

En este contexto, con frecuencia, los obtentores preguntan si las técnicas moleculares y sus resultados pueden ser utilizados para los exámenes DHE.

En 1993, se creó un Grupo de trabajo para técnicas bioquímicas y moleculares, cuyo estudio principal son los perfiles de ADN (BMT), que forman parte del grupo de UPOV.

Es importante resaltar, las ventajas y consecuencias para la protección de obtenciones vegetales que presentan las técnicas moleculares con respecto los exámenes DHE (UPOV/QUI/96/13, 1996).

Al realizar los exámenes DHE, las principales **dificultades** que se encuentran son:

- La pequeña variabilidad (algunas veces muy limitada) que se observa entre las variedades de algunas especies. Esta situación puede deberse a la base genética muy limitada utilizada por los obtentores en ciertos cultivos; sin embargo, en algunas especies también puede deberse a la falta de caracteres útiles con los que se pueden distinguir variedades.

- El efecto ambiental sobre la expresión de los caracteres. Debido a este efecto las descripciones establecidas en diferentes países y las decisiones basadas en estas descripciones no siempre son congruentes. Es necesario realizar anualmente observaciones sobre las variedades de la colección de referencia cuando se cultivan junto con las variedades candidatas. Con la introducción de caracteres que sean menos susceptibles o que carezcan totalmente de susceptibilidad a las influencias ambientales, resulta posible compilar bases de datos y comparar datos sobre variedades candidatas con datos sobre variedades en la colección de referencia recopilados años anteriores.
- El tamaño de la colección de referencia. Cada vez es mayor el número de variedades que deben incluirse en estas colecciones para poder controlar el requisito de distinción (una variedad nueva debe ser “claramente” diferente de cualquier otra variedad notoriamente conocida). Las bases de datos son la única manera de contar con una cobertura mundial de las colecciones de referencia.

Con respecto a las **consecuencias** probables de la utilización de los marcadores moleculares en la protección de obtenciones vegetales, éstas son las siguientes:

- Cada técnica molecular puede crear un gran número de caracteres. Cada sonda, SSR o “primer” puede revelar potencialmente una diferencia entre dos variedades y el número de estos instrumentos resulta, *a priori*, incontables. Una decisión arbitraria para introducir estas técnicas modificaría totalmente la capacidad de discriminar entre variedades y por lo tanto reduciría las distancias mínimas entre las mismas. En otras palabras, significa que la protección de obtenciones vegetales se debilitaría debido a la posibilidad que una o más variedades estuvieran muy cercanas a una variedad inicial con ligeras diferencias entre ellas. Es muy frecuente, con las técnicas avanzadas de mejoramiento, encontrarse con variedades cuasi-isogénicas entre sí, cuya principal diferencia estriba en algún carácter morfológico. Un ejemplo extremo de esta tendencia es el de variedades transgénicas que se obtienen por retrocruza asistida por marcadores moleculares que llevan a una introgresión casi totalmente precisa del transgén en el fondo genético de la variedad recurrente.

El resultado sería más drástico si se aceptara que se puede utilizar cualquier característica, sin perjuicio de la expresión fenotípica.

- Otro punto de gran importancia es, que ante el caso de una variedad protegida (y por lo tanto “homogénea”) de la que podrían extraerse una o más variedades mediante la utilización de técnicas moleculares simplemente porque la homogeneidad de la variedad protegida no se evaluó con la técnica molecular específica utilizadas para este fin.

En la última reunión del grupo de Técnicas Biomoleculares (BMT-UPOV) realizada en marzo de 1997, se plantearon nuevos interrogantes sobre la utilización de las técnicas moleculares en la diferenciación de variedades (BMT/4/21, 1997).

Se planteó que las técnicas moleculares son importantes ya que explican la relación existente entre las variedades, brindando información sobre el genoma de las mismas, y enfatizando su importante utilidad en la identificación pero no recomendando las mismas para estudios de diferenciación, por lo explicado con anterioridad.

La postura de la Asociación Internacional de los Seleccionadores para la Protección de las Obtenciones Vegetales (ASSINSEL), considera que las reglas DHE fueron diseñadas para describir el fenotipo de la variedad y para verificar la mínima distancia con el fin de obtener la protección de variedades.

Además, en el cuadro de la convención de UPOV (1991), se introdujo un nuevo concepto de “variedades esencialmente derivadas”, por los avances en la utilización de las técnicas de la ingeniería genética. Éstas nuevas variedades se caracterizan por tener un alto grado de semejanza entre una de las variedades parentales (la “variedad inicial”) y la variedad derivada.

De esta manera casi la totalidad de su genoma es semejante a un parental, modificando un solo carácter que la hace distinta de la que le dio origen. Por lo tanto, sugieren que la distinción se asocie con el fenotipo, mientras que el concepto de “esencialmente derivada” se asocie con el genotipo. Con la aparición de éste nuevo concepto surge el debate sobre la determinación de las distancias genéticas entre germoplasmas.

Resumiendo la posición actual, se busca de alguna manera no dañar el sistema de protección y el uso de caracteres moleculares bien distribuidos a lo largo del genoma, podrían reemplazar, complementar y compararse con algunas características fenotípicas en corriente uso e incrementar, más que disminuir, la tan discutida “distancia mínima”, pasando a considerarse, entonces, como un sistema capaz de complementar y subsanar los problemas de la utilización de los datos morfológicos.

6. MARCO Y OBJETIVOS DEL PROYECTO DE TESIS

Tradicionalmente los mejoradores de plantas utilizan características morfológicas, fisiológicas y fenológicas, para clasificar y distinguir genotipos de plantas de distintas especies.

Con el fin de obtener un certificado de propiedad para los nuevos cultivares desarrollados por las empresas semilleras, es necesario demostrar que es distinguible de “todas las variedades existentes con propiedad”.

Para todas las especies, son las características morfológicas las que determinan si una variedad es distinta de las otras. Pero en el caso de soja, debido a la escasa variabilidad genética existente entre las mismas, cada vez es más difícil lograr estos propósitos.

Existen pocos estudios en el ámbito mundial que permitan hacer una correcta **comparación de datos morfológicos y moleculares aplicados a casos reales de variedades registradas de uso comercial** para la aplicación científica de los conceptos mencionados.

En esta tesis se explora la factibilidad de aplicación de técnicas moleculares en la caracterización y diferenciación, utilizando como modelo el caso soja y, más específicamente, las variedades argentinas, para facilitar la inscripción y el control de variedades en el Registro Nacional de Cultivares (INASE).

Este trabajo muestra la comparación entre 16 características morfológicas, fisiológicas y fenológicas, utilizadas para la diferenciación con distintos tipos de marcadores moleculares, tales como **RAPD** (31 *loci*), **AFLP** (32 *loci*) y **SSR** (30 *loci*), en 100 variedades de soja registradas en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE), perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGyP).

Se busca establecer un **Documento Único de Identidad Genética** para cada variedad de soja y hacer un estudio del grado de variabilidad existente entre las mismas.

Se postulará en el caso de ser posible, un criterio para establecer un valor de similitud como parámetro de “novedad” para las nuevas variedades. Aquellas que se encuentren por encima del valor de similitud se considerarán como iguales (o “esencialmente derivadas”) y las que se encuentren por debajo de este valor las variedades serán consideradas como “novedosas”.

Otro objetivo de esta tesis consiste en **analizar los efectos de la selección del genoma de la soja cultivada** comparando marcadores “neutros” a esta selección (marcadores moleculares) y marcadores seleccionados (o mantenidos durante la selección) como el caso de los marcadores morfológicos, particularmente en casos como el peso de semillas, que indirectamente refleja el rendimiento.



MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL GENÉTICO

Se utilizó un conjunto de 100 variedades de soja cultivada (*Glycine max.* (L). Merr.), el cual fue seleccionado sobre la base de su representatividad en términos de superficies de tierras cultivadas durante la campaña 94/95. Se incluyó como referencia a la variedad “Williams cv.”, siendo una de las más antiguas y utilizada en programas de mejoramiento de la especie. La misma fue cedida por el Banco de Germoplasma de la EEA INTA Márcos Juárez.

La **Tabla I** muestra el listado de las variedades utilizadas para el estudio, superficie cultivada (ha), grupo de madurez al cual pertenecen, origen, vencimiento de la propiedad obtenida en la Argentina y su solicitante. Los datos y los materiales fueron obtenidos del Registro de Propiedad de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE), perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos.

Las 100 variedades con propiedad en la Argentina seleccionadas para este trabajo (sobre un total de 248 variedades inscriptas en el Registro de la Propiedad de Cultivares según datos 1998), corresponden, además, a las más comercializadas en nuestro país.

Tabla I. Listado de 100 variedades de soja (*Glycine max.*) con propiedad en la Argentina. Campaña 94/95. El símbolo S/P significa, sin propiedad.

CULTIVAR	SUPERFICIE (HA) CULTIVADA	GRUPO DE MADUREZ	ORIGEN	VENCIMIENTO DE LA PROPIEDAD	SOLICITANTE
RA 702	15554,75	VII	USA	2003	FACA COOP.LTDA.
A 5409	8512,00	V	ARG	2003	NIDERA S.A.
A 6404	6180,00	VI	ARG	S/P	NIDERA S.A.
NORKIN S- 641	5771,70	VI	USA	1999	ENEKA SEMILLAS S.A.
A 5401	5363,00	V	ARG	2012	NIDERA S.A.
Don Mario 49	5161,50	IV	USA	2005	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
Hood 75	4860,75	VI	USA	S/P	---
RA 587	4484,40	VI	USA	2003	FACA COOP. LTDA.
Torcaza 63	4334,50	VI	ARG	2000	BRETT S.A.
A 6381	4254,00	VI	USA	S/P	NIDERA S.A.
A 4702	4037,00	IV	ARG	2012	NIDERA S.A.
OFPEC Vencedora	4001,10	VI	ARG	2012	OFPEC S.R.L.
NORKIN S- 642	3961,00	VI	ARG	2013	ENEKA SEMILLAS S.A.

Torcacita 58	3653,80	V	ARG	2013	BRETT S.A.
A 4656	3319,00	IV	ARG	2012	NIDERA S.A.
Asgrow 5308	3258,00	V	ARG	S/P	NIDERA S.A.
Avutarda 64	3074,32	VI	ARG	2005	BRETT S.A.
Granera 73	2643,00	VII	ARG	2012	PRODUSEM S.R.L
Don Mario 43	2552,50	IV	ARG	2006	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
Federada 1 INTA	2532,80	VI	ARG	2003	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Charata 76	2449,00	VII	ARG	2012	BRETT S.A.
Famaillá-841 INTA	2346,00	VIII	ARG	2006	INTA E.E.A. FAMAILLA
A 4422	2165,50	IV	ARG	2003	NIDERA S.A.
Promax 550	2092,50	V	ARG	2012	PRODUSEM S.R.L.
Golondrina 65	2050,50	VI	ARG	2013	BRETT S.A.
Bragg	2024,50	VII	USA	S/P	---
TJ S 2000	1957,30	V	ARG	2006	AGROMANIA S.A.
Coker 237	1724,00	VII	USA	S/P	PALAOVERSICH Y CIA S.A.C.
Tacuari INTA	1627,80	V	ARG	2006	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Dekalb CX 458	1595,00	IV	USA	2007	DEKALB ARGENTINA S.A.
OFPEC Entrerriana	1509,00	VII	ARG	2013	OFPEC S.R.L.
Famaillá 940 INTA	1396,00	IX	ARG	2003	INTA E.E.A. FAMAILLA

A 7986	1303,00	VII	USA	2006	NIDERA S.A.
CX 690	1253,00	VI	USA	S/P	BEKALB ARGENTINA S.A.
A 6443	1234,50	VI	ARG	2014	NIDERA S.A.
Don Mario 57	1226,00	V	ARG	2006	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
A 3910	1143,00	III	ARG	2014	NIDERA S.A.
Oro F.C.A.	1017,50	VI	ARG	2003	UNIV. NAC. ENTRE RIOS
Don Mario 50	1015,00	V	ARG	2006	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
Menende INTA	981,00	IX	ARG	2014	INTA E.E.A. FAMAILLA
MC Nair 800	968,80	VII	USA	S/P	ENKA SEMILLAS S.A.
OFPEC Santafesina	938,50	V	ARG	2014	OFPEC S.R.L.
Martineta 50	912,00	V	ARG	2003	BRETT S.A.
Montera 74	901,00	VII	ARG	2000	BRETT S.A.
Famaillá 837 INTA	845,20	VIII	ARG	2003	INTA E.E.A. FAMAILLA
OFPEC Puntera	656,53	VI	ARG	2014	OFPEC S.R.L.

TJ S 2020	803,50	VI	ARG	2012	AGROMANIA S.A.
Doña Flor 58	734,00	V	ARG	2004	OFPEC S.R.L.
Dorada 48	713,00	IV	USA	2014	ENKA SEMILLAS S.A.
A 7894	701,00	VII	ARG	2006	NIDERA S.A.
CX 740	697,00	VII	USA	S/P	DEKALB ARGENTINA S.A.
TUC G-16	604,00	VIII	ARG	2011	E.E.A. OBISPO COLOMBRES
Reina 52	561,00	V	USA	2014	ENKA SEMILLAS S.A.
Forrest	550,50	V	USA	S/P	---
Playerita 53	547,00	V	ARG	2013	BRETT S.A.
Batara 54	536,00	V	ARG	2012	BRETT S.A.
TJ S 2043	518,80	IV	ARG	2014	AGROMANIA S.A.
A 5780	514,50	V	ARG	2014	NIDERA S.A.
OFPEC Rendidora Juan Fe	460,00	VI	ARG	1998	OFPEC S.R.L.
ACA 731	448,00	VII	ARG	2014	ASOC. COOP. ARGENTINAS C.L.
A 3205	429,00	III	USA	S/P	NIDERA S.A.
Don Mario 55	425,00	V	USA	2005	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
A 7372	419,00	VII	USA	S/P	NIDERA S.A.
Conesa FA-INTA	414,50	V	ARG	2014	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
OFPEC Norteña	404,00	VII	ARG	2013	OFPEC S.R.L.

ACA 681	402,50	VI	ARG	2014	ASOC. COOP. ARGENTINAS C.L.
Promax 530	383,00	V	ARG	2012	PRODUSEM S.R.L.
Carmen INTA	379,00	III	ARG	2013	INTA E.E.A. BORDENAVE
Primavera 100	374,00	IV	ARG	2015	COMPAÑÍA SEMILLERA DEL NORTE
A 7306	365,00	VII	ARG	S/P	NIDERA S.A.
OFPEC Cordobesa	325,00	VI	ARG	2012	OFPEC S.R.L.
ACA 571	300,00	V	ARG	2015	ASOCIACION COOP. ARGENTINA C.L.
Copetona 53	279,00	V	ARG	2001	BRETT S.A.
Calandria 55	276,00	V	ARG	2013	BRETT S.A.
Tijereta 42	269,00	IV	ARG	2005	BRETT S.A.
Maxisoy 601	214,00	VI	ARG	S/P	CARGILL S.A.
FT 11 Alvorada	193,00	IX	BRA	S/P	COMPAÑÍA SEMILLERA DEL NORTE
Norkin S-555	193,00	V	ARG	S/P	ENEKA SEMILLAS S.A.
Don Mario 48	170,00	IV	USA	2015	ASOCIADOS DON MARIO S.R.L.
Rojas FA- INTA	167,80	V	ARG	2014	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Tresur 455	150,00	IV	USA	2012	AGROTECNICA EL TREBOL SUR S.R.L.

Don Eduardo 510	141,00	V	USA	2014	SANTA URSULA S.A.A.I.C.
Federada Casilda INTA	129,80	V	ARG	2004	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Tancacha INTA	122,00	VI	ARG	2003	INTA E.E.A. MANFREDI
9501	113,00	V	USA	2007	PIONEER OVERSEAS CORPORATION
9442	108,50	IV	USA	2006	PIONEER OVERSEAS CORPORATION
Arequito FA INTA	101,80	V	ARG	2012	INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Semit 500	98,00	V	USA	2015	FOUNDATION S.A.
Cerrito FA- INTA	93,50	VII	ARG	2014	INTA E.E.A. PARANA
Don Eduardo 375	91,00	III	USA	2012	SANTA URSULA S.A.A.I.C.
Colorada 37	85,00	III	ARG	2012	BRETT S.A.
Cobriza F.C.A	71,00	VII	ARG	2014	UNIV. NAC. ENTRE RIOS
TJ S 2065	63,00	VI	ARG	2014	AGROMANIA S.A.
OFPEC Rendidora 627	61,00	VI	ARG	S/P	OFPEC S.R.L.
Ramson	49,00	VII	USA	S/P	---
Tresur 321	35,00	III	USA	2005	AGROTECNICA EL TREBOL SUR S.R.L.

Famailla 701 INTA	30,00	VII	ARG	2003	INTA E.E.A. FAMAILLA
Caminera 32	25,00	III	ARG	2012	BRETT S.A.
Carcarañá INTA	24,00	VI	ARG		INTA E.E.A. MARCOS JUAREZ
Williams	REFERENCIA	III	USA	S/P	---

2. ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Se realizó un ensayo a campo de las 100 variedades de soja, con el fin de analizar las características –morfológicas, fisiológicas y fenológicas- que permiten su caracterización y diferenciación.

El protocolo empleado fue el estipulado por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV), en su documento de referencia (TG/80/3, Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability, 1983), adoptado en Argentina y utilizado por el Registro de Propiedad de Cultivares (INASE).

Siguiendo los protocolos internacionales se analizaron 200 plantas con una o más repeticiones. El tamaño de las parcelas debe ser tal, que las plantas o partes de las plantas, puedan ser removidas para su cuantificación sin perjudicar la observación, aún en estadios

avanzados del crecimiento. La observación sólo puede realizarse, cuando todos los materiales a comparar están sujetos exactamente a las mismas condiciones ambientales.

El ensayo fue llevado a cabo en parcelas de la Facultad de Agronomía, Universidad de Morón (Prov. de Buenos Aires), bajo condiciones normales e iguales de crecimiento, comenzando en el mes de enero hasta julio de 1998. Se sembraron para cada variedad tres surcos de 400 semillas, contadas con contador y sembradas a mano, con una separación de 20 cm entre cada semilla. Cada surco se separó a 45 cm del siguiente para facilitar la observación.

La **Foto 1**, muestra las parcelas del campo experimental y la **Foto 2**, muestra los tres surcos sembrados para cada variedad, (Campaña 1997/98).



Foto 1 Campo experimental. Variedades de soja con propiedad en la Argentina, sembradas en la Facultad de Agronomía, Universidad de Morón. (Moreno, Prov. de Buenos Aires). Campaña 1997/98.



Foto 2 Campo experimental. Parcela de tres surcos correspondientes a una variedad, sembrada en la Facultad de Agronomía, Universidad de Morón. (Moreno, Prov. de Buenos Aires). Campaña 1997/98.

Con el fin de realizar la comparación entre los materiales, primeramente se consideraron un grupo de ocho características cualitativas, según las utilizadas en el Registro de Propiedad (INASE). Son las siguientes:

1. Tipo de crecimiento de la planta
2. Tipo de planta
3. Color de pubescencia
4. Forma del folíolo
5. Color de la flor
6. Reacción al test de peroxidasa
7. Color del hilo de la semilla
8. Grupo de maduración

Estas son las características más recomendadas debido a que, por conocimientos experimentales, han demostrado ser las más estables, si varían, sólo se produce finamente dentro de la variedad.

En condiciones normales de inscripción de una nueva variedad, si luego del análisis de las 8 características morfológicas mencionadas no es posible diferenciarla del resto ya existentes en el Registro de Propiedad, se solicita mayor información al solicitante, basada también en características morfológicas, fisiológicas y/o fenológicas. Esta información es analizada y en el caso que el analista la considere suficiente, podrá dar por terminado el proceso de la diferenciación.

Por esta razón fue necesario seleccionar más características morfológicas. Se seleccionaron preferentemente aquellos caracteres menos sujetos a la influencia del ambiente en el que se desarrolló el análisis. Específicamente, se consideraron siete características cualitativas y una cuantitativa más:

9. Color de la vaina
10. Tonalidad del fruto
11. Color de hoja
12. Color del hipocótilo
13. Tono de pubescencia
14. Brillo del tegumento
15. Forma de la semilla
16. Peso de 1000 semillas

2.1 Tipo de crecimiento de la planta

Se observaron tres tipos de variantes:

- 1: Determinada
- 2: Semi-determinada
- 3: Indeterminada

Las plantas de soja muestran una considerable variación en la terminación del tallo, pero la mayoría de las mismas son clasificada en plantas de crecimiento indeterminado (*Dtl*) o determinado (*dtl*), descripto por Woodworth (1932, 1933) y Bernard (1972).

Las diferenciaciones entre las categorías determinada e indeterminada se deben más al tiempo de terminación del crecimiento del tallo que a la manera de terminación del mismo (Bernard, 1972).

Con respecto al tipo de crecimiento de las plantas en forma semi-determinada (*Dt2*) descrito por Bernard (1972), éste presenta una moderada terminación del tallo. Ambas características *Dt1* y *dt1* están representadas en la mayoría de los cultivares analizados, mientras que *Dt2* está representada en una escasa cantidad de los mismos.

Estos datos no pudieron ser corroborados en el experimento a campo debido a que las variedades pertenecen a distintos grupos de maduración y habría que analizarlos en diferentes localidades ubicadas a latitudes para las que están específicamente adaptadas, por lo que fueron obtenidos del Registro de Propiedad del INASE.

2.2 Tipo de planta

Se observaron tres tipos de variantes:

- 1: Sin ramificación
- 2: Intermedio
- 3: Ramificada

Gracias al estudio de un mutante de entrenudos cortos (Kilen y Hatrwig, 1975) se estableció que la característica tallo ramificado está controlada por un alelo recesivo, *sb1* (Kilen, 1977). Más tarde se estableció que un segundo *locus* (*sb2*), también es responsable del control de dicha característica (Boerma y Jones, 1978). Por lo tanto el genotipo *sb1 sb1 sb2 sb2* se caracteriza por la expresión de una

precoz expansión de las yemas axilares, que resulta en un desplazamiento lateral, desarrollando entrenodos cortos. El fenotipo sin ramificación es, por lo tanto, resultado de la expresión de los alelos dominantes *Sb1* o *Sb2*.

A las pocas semanas de su crecimiento fueron observadas las plantas y corroborados los datos presentes en los archivos del Registro de Propiedad del INASE.

2.3 Color de pubescencia

Se observaron dos variantes:

1: Gris

2: Marrón

Las variantes están controladas por un gen simple. Un alelo dominante (*T*) confiere el color marrón y un alelo recesivo (*t*), el color gris. En plantas jóvenes el color no se encuentra definido, por esta razón ésta característica fue analizada luego de varias semanas de crecimiento de las plantas.

La pigmentación es retenida en los estadíos maduros facilitando de esta manera su observación principalmente en los tallos. El color marrón, indica la presencia de una enzima la quercetina, mientras que en los cultivares con pubescencia gris denotan la ausencia de la misma.

Se procedió a observar la mayoría de las plantas para cada variedad, presentes en los tres surcos y se determinaron los resultados.

2.4 Forma del folíolo

Se analizaron cuatro variantes:

1: Lanceolado

2: Oblongo

3: Oval

4: Elíptica

El follaje de la planta es de tipo trifoliado y varía su forma desde oblongo, pasando por ovalado y terminando en lanceolado (Dzizcovski, 1936). La diferencia está dada por el tamaño del eje longitudinal (de 4 a 20 cm), con respecto al eje transversal (de 3 a 10 cm). Las de tipo elíptico, cuyo eje transversal es de 4 a 5 cm, en plantas maduras, son las menos frecuentes.

La característica está determinada por un gen. Las formas más anchas (de tipo ovaladas), resultan del alelo dominante (L_n) y para las formas más angostas (de tipo oblongo o lanceolado), del alelo recesivo (ln).

La observación se realizó según la convención, basando el resultado en las observaciones en la forma general presente en la población y siempre analizando el folíolo central (hoja central de mayor tamaño).

2.5 Color de flor

Se analizaron dos variantes:

1: Púrpura

2: Blanca

Las plantas cultivadas presentan dos tipo de color de flor, determinados por un gen. El color púrpura es determinado por el alelo dominante (*W1*) y el color de flor blanca por el alelo recesivo (*w1*) (Takahashi y Fukuyama, 1919).

Existe efecto pleitrópico del alelo *W1*, dando pigmentación púrpura sobre el hipocótilo de la plántula, con respecto al alelo *w1*, el cual le confiere color verde.

Las observaciones se realizaron sobre el total de las plantas sembradas por variedad y en el estadio de reproducción 2, donde las flores están abiertas y se puede observar fácilmente el color de las mismas.

2.6 Reacción al test de peroxidasa

Se analizaron dos variantes:

1: Positivo

2: Negativo

La acción de la enzima, peroxidasa, se encuentra regulada por un gen con dos variantes, una confiere alta actividad de peroxidasa (*Ep*) y la otra baja actividad de peroxidasa (*ep*), evidenciándose la característica a través de un color rojo-amarronado (para la reacción

positiva) e incoloro (para la reacción negativa) a los pocos minutos de iniciada la incubación.

La tecnología utilizada fue la descrita por Buttery *et al.* (1968). Se extrajeron los tegumentos (donde está presente la enzima) de 50 semillas de cada variedad y se las colocó sobre una placa plásticas de 96 hoyos.

Se prepararon dos soluciones (A) y (B):

A: 1 gr de bencidina con 9 ml de ácido acético glacial y 36 ml de agua destilada, calentada a 50°C hasta su disolución.

B: Se tomaron 3 ml de peróxido de hidrógeno (30 vol.) y se llevaron a 50 ml con agua destilada. De esta solución se tomó 1 ml y se la llevó a 20 ml con agua destilada. Se preparó en el momento del uso.

Se mezclaron 3 ml de la solución (A) con 3 ml de la solución (B) y se volcaron 2 gotas de la solución sobre los tegumentos de las semillas, preparadas sobre la placa de ELISA.

Se esperaron de 2 a 3 minutos y se evaluó la reacción positiva o negativa, para cada variedad.

Estos resultados fueron obtenidos en el Laboratorio Central de Análisis de Semillas, INASE.

2.7 Color del hilo de la semilla

Se analizaron las siguientes variantes:

- 1: Amarillo
- 2: Castaño claro
- 3: Castaño oscuro
- 4: Gris
- 5: Negro imperfecto
- 6: Negro
- 7: Otros

Los materiales fueron comparados con semillas de color de hilo de referencia, presentes en el Laboratorio Central de Análisis de Semillas, INASE. Para cada variedad se consideraron un total de 50 semillas tomadas al azar y se determinó la coloración del hilo, sobre el total de las mismas.

Los genes que controlan el color del hilo son, *I*, *R*, *T* y *Wl* (Rode y Bernard, 1975). Son los mismos que controlan la distribución y el color del pigmento de la semilla (*I*, *R* y *O*), la pubescencia (*T*, *t*) y el color de la flor (*Wl*, *wl*). De esta manera dependiendo del tipo de pigmento de la semilla, del color de flor, etc., se puede determinar cuales son los genes que intervienen en la coloración del hilo. Por otro lado pueden producirse diversas combinaciones de genes que den el mismo color del hilo.

2.8 Grupo de maduración

Se analizaron las siguientes variantes, según la escala americana:

1: 000

2: 00

3: 0

4: I

5: II

6: III

7: IV

8: V

9: VI

10: VII

11: VIII

12: IX

13: X

Existen cuatro genes involucrados en el tiempo de floración y maduración (*E1*, *E2*, *E3* y *E4*), descritos por Owen (1927), Bernard (1971), Buzzel y Voldeng (1980). La soja es una especie de días cortos y la variación entre los grupos de madurez está dada fundamentalmente por los requerimientos de fotoperíodo de los cultivares.

La soja cultivada es clasificada, según el sistema americano, dentro de distintos grupos de madurez, ordenados desde 000 a X. En nuestro país prevalecen las de grupo II a IX, por lo tanto se analizaron sólo

estos grupos.

Los datos fueron extraídos de los archivos del Registro de Propiedad de Cultivares del INASE. Al igual que para el carácter de indeterminación/determinación del tallo, no fue posible hacer el análisis a campo por la necesidad de requerir su cultivo en distintas regiones de la República Argentina, representativas de las diferencias en fotoperíodo.

2.9 Color de Vaina

Se analizaron las siguientes variantes:

- 1: Tostado
- 2: Negro
- 3: Castaño
- 4: Gris

La vaina puede contener de 1 a 5 semillas, pero en las plantas cultivadas normalmente varían de 1 a 3. Los colores varían desde el tostado hasta el negro y depende de la presencia o ausencia de distintos pigmentos (ver tonalidad del fruto).

El carácter se encuentra regulado por dos genes *L1* y *L2*. Se sabe que *L1L2* confiere un color negro, al igual que *L1l2*, el color castaño está determinado por *l1L2* y el color gris por *l1l2* (Bernard, 1967).

Los datos fueron obtenidos a campo, en la etapa de reproducción R4 o R5 y corroborados de los archivos del Registro de Propiedad del INASE.

2.10 Tonalidad del fruto

Se observaron tres variantes:

- 1: Clara
- 2: Intermedia
- 3: Oscura

La vaina madura (fruto), varía de tonalidades, según la clasificación, dependiendo de la presencia o ausencia de los pigmentos de caroteno y xantofil, el color de los tricosomas y la presencia o ausencia de pigmentos de antocianinas (Dzikowski, 1936).

Los resultados fueron obtenidos directamente a campo en la etapa de reproducción R5 y corroborados con los datos del archivo del INASE.

2.11 Color de la hoja

Se observaron tres variantes:

- 1: Verde claro
- 2: Verde intermedio
- 3: Verde oscuro

Se observó la población de 400 plantas para cada variedad y se determinó el color de las hojas, claro, intermedio u oscuro. El resultado se obtuvo sobre la totalidad de coloración en la población, comparando con tres muestras de referencias, cuyo color es conocido. La observación se realizó a los 120 días de la siembra donde el follaje se encontraba ya bien desarrollado.

2.12 Color del hipocótilo

Se observaron las siguientes variantes:

- 1: Verde
- 2: Verde claro
- 3: Púrpura
- 4: Púrpura intenso

Se conoce un efecto pleiotrópico del alelo *W1* (flor de color púrpura) que tiene como consecuencia conferir pigmentación púrpura al hipocótilo de la plántula y el alelo *w1* (flor de color blanca por ausencia de pigmento), tampoco confiere pigmentación al hipocótilo, quedando este de color verde. Diversas investigaciones demostraron que el pigmento predominantemente responsable de la coloración púrpura en el hipocótilo, es la antocianina (Nozzolillo, 1973), la cual no se sintetiza en el caso del hipocótilo verde.

Los datos fueron obtenidos del Laboratorio Central de Análisis de Semillas, INASE.

2.13 Tono de pubescencia

Se observaron las siguientes variantes:

- 1: Clara
- 2: Intermedia
- 3: Oscura

Se describió (Buttery y Buzzel, 1973) y (Bernard, 1973) la acción de un gen *Td* que afecta solamente la tonalidad de la

pubescencia. El alelo *Td* controla las tonalidades más oscuras y *td* las mas claras.

Las observaciones se realizaron a campo y se controlaron con los datos presentes en los archivos del Registro de Propiedad del INASE.

2.14 Brillo del tegumento

Se analizaron dos variantes:

1: Opaco

2: Brillante

B1 B2 B3 son los genes involucrados en el brillo del tegumento de la semilla (Woodworth, 1932, 1933) y los alelos recesivos de los mismos *b1*, *b2* o *b3* determinan la ausencia de brillo del tegumento (Tang y Tai, 1962). Los datos fueron extraídos de los archivos del Registro de Propiedad del INASE.

2.15 Forma de la semilla

Se analizaron las siguientes variantes:

1: Esférica

2: Esférica achatada

3: Alargada

4: Alargada achatada

No hay datos sobre los genes involucrados en la forma de la semilla. Los resultados fueron obtenidos del archivo de datos del Registro de propiedad del INASE.

2.16 Peso de 1000 semillas

Es una característica de tipo “cuantitativa”, por lo tanto varía numéricamente en su expresión de forma que, *a priori*, resulta difícil distinguir clases definidas. La variación numérica para un carácter “cuantitativo” se atribuye tanto a su herencia compleja (participan varios genes distintos) como a su susceptibilidad a variar debido a influencias ambientales.

Para minimizar las variaciones debidas a las influencias ambientales se trabajó con un alto número de semillas (1000) utilizando tres repeticiones. El peso de las 1000 semillas se expresó en gramos, y el valor adjudicado resulta de calcular la media de las repeticiones del ensayo. Para evitar las distorsiones debidas a reducciones en el rendimiento de las plantas no adaptadas al ambiente de la zona de la Provincia de Buenos Aires donde se realizó el ensayo, se prefirió pesar las semillas presentes en las cámaras del INASE, que fueron enviadas oportunamente por cada una de las empresas anteriormente nombradas en la **Tabla I**, después de cultivarlas en los ambientes en que fueron mejoradas genéticamente.

3. EXTRACCIÓN DE ADN

Para obtener el ADN genómico de las 100 variedades de soja (*Glycine max.*), se sembraron 5 semillas de cada variedad en macetas de plástico de 30 cm de profundidad por 25 cm de diámetro, en una mezcla de $\frac{3}{4}$ de tierra y $\frac{1}{4}$ de arena, respectivamente autoclavadas y tamizadas.

Las plantas fueron crecidas en el invernáculo del Instituto de Recursos Biológicos del INTA - Castelar, con temperatura (20-25°C), luz (33.000 lux de tubos blancos fluorescentes) y humedad (sin datos) controladas, estipuladas por el Handbook of Variety Testing, ISTA, (1993). Al mes de crecimiento, se cosecharon 4 hojas jóvenes de cada una de las cinco plantas pertenecientes a cada variedad y se liofilizaron durante 3 días, luego de lo cual fueron molidas hasta un fino polvo en un aparato *ad hoc* del tipo molinillo (Marca SANYO, para café de grano grueso). La **Foto 3**, muestra las variedades sembradas en el invernáculo al tiempo de su cosecha.



Foto 3 Variedades de soja, sembradas en el invernáculo del Instituto de Recursos Genéticos del INTA – Castelar. Los materiales están listos para ser cosechados y extraídos sus respectivos ADNs.

Para cada extracción se partió de aproximadamente de 400 mg de material molido y se realizó la extracción mediante el método de CTAB modificado por Saghai-Maroo *et al.* , (1984), con adaptaciones del método descripto por Lodhi *et al.* , (1994).

Componentes del buffer de extracción:

Componentes	[final]
Tris pH 7,5	100 mM
NaCl	700 mM
EDTA pH 8,0	50 mM
CTAB	1 %
B-mercaptoetanol	140 mM

El tejido fue incubado en el buffer de extracción 60-90 min. a 65°C con agitación. Luego de tratar dos veces con cloroformo:octanol (24:1 v/v), se precipitó el ADN con isopropanol (2:3 v/v) y se lo lavó con etanol 70% .

La cuantificación del ADN se realizó por medio de espectrofotometría ultravioleta, asumiendo una equivalencia de 1 OD (260nm) = 50ug. Paralelamente se realizó una verificación de la integridad de ADN extraído, sembrando 2 ul del mismo en un gel de 1% agarosa TAE 1x teñido con EtBr (Sambrook *et al.*, 1989). Una vez cuantificados todos los ADNs se los llevo a una concentración de 5 ng/ ul.

Algunos materiales se les extrajo dos veces el ADN, como control de reproducibilidad del proceso y de sus resultados.

4. ANÁLISIS DE RAPD

Se utilizó el sistema descrito por Williams *et al.* (1990), con algunas modificaciones.

4.1 Determinación de “primers” informativos

El primer paso del estudio de obtención del “documento de identidad genético” y de la variabilidad existente entre variedades de soja con marcadores RAPD, es identificar “primers” que revelen polimorfismos. Para esto se amplificaron los ADNs genómicos de 10 variedades poco relacionadas entre sí, de acuerdo a informaciones previas tanto, en cuanto a características morfológicas y como de pedigrí.

Se chequearon 70 “primers” de 10 pb de longitud (“kits” X, Y, A y C; OPERON Technologies, EUA), con las 10 variedades anteriormente mencionadas. Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 ul conteniendo:

Componentes	Volumen
10x Stoffel Buffer	2,50 ul
25 mM MgCl ₂	4,00 ul
10 mM dNTP	0,25 ul
16 ng/ul 10-mer Primer (1)	1,00 ul
10 U/ul Stoffel (2)	0,20 ul
ddH ₂ O	12,05 ul
5 ng/ul ADN	5,00 ul

(1) Operon Technologies Inc., EUA

(2) ADN polimerasa Fragmento Stoffel (Perkin Elmer Cetus, EUA)

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador TC480 (Perkin Elmer Cetus, EUA) con el siguiente programa:

1 ciclo	94°C 3 min
40 ciclos	94°C 1 min
	35°C 1 min
	72°C 2 min
1 ciclo	72°C 7 min

Los productos generados fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (1,5%; TBE 1x; 8 V/cm; 4 hs) teñido con EtBr. Los geles fueron luego visualizados con luz UV y fotografiados.

4.2 Análisis con marcadores RAPD seleccionados

Una vez determinados los “primers” informativos, se procedió a amplificar los ADNs genómicos de las 100 variedades argentinas con el protocolo anteriormente descrito. Se utilizaron los “primers” seleccionados y se estudió el polimorfismo existente entre todas las variedades. Al ser los RAPD marcadores dominantes, se cuantificó el tamaño de los fragmentos polimórficos, en pares de bases, comparando con un marcador de peso molecular, 50 pb de Promega Biotech, EUA.

5. ANÁLISIS DE AFLP

Se utilizó básicamente el protocolo de Keygene N.V., Wageningen, Netherlands, adaptándolo al sistema de revelación con plata desarrollado por la Lic. Susana Marcucci Poltri del Laboratorio de Marcadores Moleculares, Instituto de Biotecnología, CICV – INTA

Castelar como se detalla a continuación.

5.1 Digestión – Ligación

Se realizó la digestión y la ligación al mismo tiempo, durante 4 hs 30 min. a 37°C partiendo de 500 ng de ADN genómico, para las 100 variedades de soja, en un volumen final de 30 ul.

Primeramente se preparó la mezcla para las digestiones. Las mismas se realizaron con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*), en un volumen final de 25 ul con los siguientes reactivos:

Componentes	Volumen
5x Buffer RL (1)	5,000 ul
10 U/ ul <i>EcoRI</i>	0,270 ul
4 U/ ul <i>MseI</i>	0,625 ul
ddH ₂ O	14,105 ul
0,1 ug/ ul ADN	5,000 ul

(1) RL: Restricción – Ligación

En segundo lugar se preparó la mezcla para la ligación de adaptadores para cada enzima. El volumen final es de 5 ul, con los siguientes reactivos:

selectivos (+3) y (+4).

En ambos casos se utilizó un ciclador térmico MJ Research modelo PTC-100 (MJ, Research, Inc., Watertown, MA).

5.2.1 Pre-amplificación

Las pre-amplificaciones se realizaron en 25 ul de volumen final, conteniendo cada una:

Componentes	Volumen
10x PCR Buffer LD	2,500 ul
50 mM MgCl ₂	1,500 ul
10 mM dNTP	0,500 ul
1 ug/ ul Primer EcoRI (+1)	0,075 ul
1 ug/ ul Primer MseI (+1)	0,075 ul
5 U/ ul Taq LD DNA polimerasa	0,200 ul
ddH ₂ O	16,150 ul
Producto de ligación	4,000 ul

“primer” *EcoRI* (+1) = 5´ GACTGCGTACCAATTCA 3´
“primer” *MseI* (+1) = 5´ GATGAGTCCTGAGTAAA 3´

La PCR se realizó con 30 ciclos del siguiente programa:

30 s	94°C
30 s	60°C
60 s	72°C

Los productos fueron chequeados en gel de agarosa 1% (TAE 1x) y almacenados a -20°C , para ser utilizados como templado de la amplificación selectiva.

5.2.2 Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva se utilizaron 5 combinaciones de primers *EcoRI/MseI* con tres y cuatro nucleótidos selectivos (+3) y (+4). Las reacciones se realizaron en un volumen de 22 μl , conteniendo los siguientes componentes:

Componentes	Volumen
10x Buffer de PCR	2,00 μl
50 mM MgCl_2	0,60 μl
10 mM dNTP	0,40 μl
1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ “primer” <i>EcoRI</i> (+3)/(+4)	0,03 μl
1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ “primer” <i>MseI</i> (+3)/(+4)	0,03 μl
5 U/ μl Taq ADN polimerasa	0,10 μl
ddH ₂ O	16,84 μl
Producto de pre-amplificación	2,00 μl

“Primers” *EcoRI* (+3)

E36: 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'

E40: 5' GACTGCGTACCAATTCAGC 3'

“Primers” *EcoRI* (+4)

E125: 5' GACTGCGTACCAATTCAGT 3'

E126: 5' GACTGCGTACCAATTCAGT 3'

“Primers” *MseI* (+3)

M45: 5' GATGAGTCCTGAGTAAATG 3'

M43: 5' GATGAGTCCTGAGTAAATA 3'

“Primers” *MseI* (+4)

M141: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGTG 3'

M142: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGTT 3'

5.3 Análisis en geles de poliacrilamida

Posteriormente a la amplificación selectiva los productos fueron mezclados con 10 ul de buffer de carga (98% formamida, 10 mM EDTA, pH 8.0; 0,05% de azul de bromo fenol y 0,05% xilene cyanol), desnaturalizados a 95°C por 5 min. y puestos inmediatamente en hielo.

Se sembraron 8 ul de cada muestra en geles 6% desnaturalizantes de poliacrilamida. Los geles se corrieron en TBE 1x a 60 W durante 3hs 30 min.

5.4 Revelación con nitrato de plata

Los geles fueron revelados esencialmente mediante adaptación a los AFLP del sistema diseñado por Promega Biotech (EUA) para geles de secuenciación nucleotídica. Luego de finalizada la corrida en geles de poliacrilamida se inicia la revelación con nitrato de plata.

Los pasos fueron los siguientes:

- (a) Se fijó 20 min en solución de ácido acético glacial 10%.
- (b) Se lavó 3 veces durante 2 min con ddH₂O.
- (c) Se tiñó 30 min con el “kit” de solución de nitrato de plata.
- (d) Se lavó 5 seg con ddH₂O fría (paso limitante).
- (e) Se reveló 2 veces durante 2 min con el “kit” de solución reveladora.
- (f) Se fijó 2 a 3 min en solución de ácido acético glacial 10%.
- (g) Se lavó 2 veces durante 2 min con ddH₂O.
- (h) Se secó toda la noche a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Al ser los AFLP marcadores dominantes (como los RAPD), se seleccionaron las bandas polimórficas y se compararon sus posiciones con las de marcador de tamaño molecular pGEM® DNA Markers (Promega Biotech, EUA) y con las bandas generadas mediante una reacción de secuenciación GATC del M13ssDNA, adaptado para revelación con plata, con el fin de determinar con exactitud las longitudes nucleotídicas de los productos de PCR amplificados.

6. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES O SIMPLES SECUENCIAS REPETITIVAS (SSR)

6.1 Microsatélites analizados

Se analizaron 30 microsatélites, según las condiciones descritas por Akkaya *et al.* (1995), con leves modificaciones para el sistema de revelación con nitrato de plata.

La información sobre las secuencias nucleotídicas de “primers” complementarios a secuencias flanqueantes de 30 *loci* cromosómicos de microsatélites de soja analizados en este trabajo, fue generosamente suministrada por el Dr. Perry B. Cregan of Soybean and Alfalfa Research Laboratory (USDA-ARS) quien los desarrolló y caracterizó, sobre genotipos de soja de los EUA. Los mismos fueron seleccionados sobre la base de su localización en distintas posiciones del genoma de acuerdo a informaciones de mapas genéticos. Algunos datos, como el mapa genético y la secuencia de los microsatélites, están publicados Akkaya *et al.* (1995) y otros son aún confidenciales (Dr. Perry B. Cregan, USDA-ARS), por lo que las secuencias de los “primers” pertenecientes a estos últimos no fueron incluidos en este trabajo.

Con propósitos comparativos se utilizó un genotipo de referencia “Williams”, para calcular el tamaño de los alelos respectivos de cada *locus*, algunos datos son públicos y otros fueron determinados y chequeados con los resultados obtenidos por el Dr. Perry B. Cregan (USDA-ARS, EUA).

Los *loci* con microsatélites analizados en las 100 variedades de soja, inscriptas en los Registros de Propiedad del INASE, fueron los siguientes:

LOCUS	LOCUS	LOCUS
BARC-SATT001	BARC-SATT100	BARC-SATT168
BARC-SATT002	BARC-SATT114	BARC-SATT534
BARC-SATT005	BARC-SATT177	BARC-SATT414
BARC-SATT009	BARC-SATT226	BARC-SATT577
BARC-SATT030	BARC-SATT294	BARC-SATT259
BARC-SATT038	BARC-SATT253	BARC-SATT172
BARC-SATT042	BARC-SATT231	BARC-SATT358
BARC-SATT045	BARC-SATT353	BARC-SATT357
BARC-SATT046	BARC-SATT175	BARC-SATT324
BARC-SATT070	BARC-SATT173	BARC-SATT249

El nombre completo de los *loci* incluye el prefijo **BARC**, por “Beltsville Agricultural Research Center”, EUA, pero usualmente es omitido por fines de abreviación. **SATT**, significa *locus* cuyo “motivo de repetición” es un tri- nucleótido **ATT**.

6.2 Amplificaciones

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 30 • l, conteniendo 75 ng de ADN genómico. Los componentes utilizados son los siguientes:

Componentes	Volumen
10x Taq Buffer	3,130 ul
10 mM dNTP	0,625 ul
10 μ M “primer” sentido (2)	0,450 ul
10 μ M “primer” anti-sentido (2)	0,450 ul
5 U/ μ l Taq ADN polimerasa (1)	0,450 ul
ddH ₂ O	9,810 ul
5 ng/ μ l ADN	15,000 ul

(1) ADN polimerasa fragmento (Perkin Elmer Cetus, EUA)

(2) “primers” específicos de un *locus*

Las amplificaciones se realizaron en dos tipos de termocicladores: TC480 (Perkin Elmer Cetus, EUA) y MJ Research modelo PTC-100 (MJ, Research, Inc., Watertown, MA). Se modificó en un grado la temperatura de apareamiento (“annealing”), en una de las máquinas, con el fin de eliminar las sombras producidas en el termociclador MJ, Research. Para el primero la temperatura fue de 47°C (Perkin Elmer

Cetus, EUA) y en el segundo caso de 48°C (MJ, Research, Inc., Watertown, MA).

El programa utilizado fue el siguiente:

1 ciclo	94°C	3 min
35 ciclos	94°C	25 s
	47/48°C	25s
	68°C	25 s
1 ciclo	72°C	7 min

6.3 Análisis en geles de poliacrilamida

Posteriormente a la amplificación selectiva, los productos fueron mezclados con 6 ul de buffer de carga (98% formamida, 10 mM EDTA, pH 8.0; 0,05% de azul de bromo fenol y 0,05% xilene cyanol), desnaturalizados a 95°C por 5 min. y puestos inmediatamente en hielo.

Se sembraron 6 ul de cada muestra en geles 6% desnaturalizantes de poliacrilamida. Los geles se corrieron en TBE 1x a 60 W durante 3hs. Primeramente se corrieron todos los microsatélites con cinco muestras con el fin de determinar cuál era el rango de tamaño de los alelos para cada *locus*. En segundo lugar conociendo los tamaños de los mismos se utilizó el sistema de multiplex, en el cual se analizaron de uno a tres *locus/loci* en un mismo gel.

6.4 Revelación con nitrato de plata

Los geles fueron revelados, según el sistema descrito por Promega Biotech, EUA. Luego de finalizada la corrida en geles de poliacrilamida se inicia la revelación con nitrato de plata, según lo explicado en el punto 5.4.

Al ser los SSR marcadores co-dominantes (es posible ver todos los distintos tipos de alelos), se compararon sus posiciones en el gel con las de un marcador de tamaño molecular pGEM® DNA Markers (Promega Biotech, EUA) y con las bandas generadas mediante una reacción de secuenciación GATC del M13ssDNA, adaptado para revelación con plata, con el fin de determinar las exactas longitudes nucleotídicas de cada uno de los alelos presentes en un *locus*.

7 ANÁLISIS DE DATOS

7.1 Obtención del “documento de identidad genético”

Todos los geles fueron analizados manualmente e independientemente. En primer lugar se realizó la obtención de la “huella digital genética” (“fingerprint”) para cada variedad, con los distintos tipos de marcadores moleculares (RAPD, AFLP y SSR).

Para las técnicas que utilizan marcadores alélicamente dominantes (AFLP y RAPD), se midieron los tamaños de las bandas polimórficas en números de pares de bases, según lo explicado en los puntos anteriores por comparación con la migración de un marcador de tamaño molecular y con la de una secuencia nucleotídica (puntos, 4.2 - RAPD y 5.4 - AFLP).

En el caso de la técnica con marcadores de visualización co-dominante (SSR), se midieron los tamaños en pares de bases de cada alelo presente en cada locus, comparando con la del alelo presente en la muestra de referencia “Williams cv.”, (cuyo tamaño es conocido para algunos de los loci analizados y con la de un marcador de tamaño molecular, así como un patrón de secuencia nucleotídica adaptada a revelación con plata, explicado en el punto 6.2.

7.2 Análisis multivariado

Después de computar los resultados, se realizó un análisis estadístico de los perfiles de ADN así como de los datos obtenidos del análisis de las características morfológicas. Consistieron, usualmente de tres pasos:

- Análisis de datos de los perfiles
- Cálculo de distancias genéticas
- Relación genética por análisis de dendrogramas

Las unidades clasificadas, OTUs (“Operational Taxonomic Unit”), son las variedades con propiedad en Argentina, descriptas en la Tabla 1. del punto 1, correspondientes a materiales genéticos. Los tipos de caracteres analizados fueron los siguientes:

1. Morfológicos (características cualitativas y cuantitativas)
2. Marcadores RAPD
3. Marcadores AFLP
4. Marcadores SSR

7.2.1 Análisis de datos de los perfiles

Existen distintas categorías de datos y se han propuesto numerosas clasificaciones para expresar la variabilidad (Walker, 1968; Bunge, 1969; Cohen y Nagel, 1971; Sneath y Sokal, 1973; Clifford y Stephenson, 1975).

Por lo tanto para la construcción de la Matriz Básica de Datos (MBD), todos los datos obtenidos fueron transformados a doble-estado, “presencia/ausencia” o también considerados como “todo o nada”, con el fin de seleccionar el mismo coeficiente de similitud y lograr una comparación entre las técnicas moleculares entre sí y cada una de ellas con respecto a los análisis morfológicos realizados.

De acuerdo a lo explicado con anterioridad, se trabajaron con tres tipos distintos de datos:

- Datos multiestados cualitativos con secuencia lógica. Es el caso de caracteres cualitativos que pueden ser ordenados en una secuencia de magnitud de la cualidad estudiada.
- Datos multiestados cualitativos sin secuencia lógica. Son datos cualitativos que no pueden ser ordenados en una secuencia de magnitud de la cualidad estudiada.
- Datos multiestados cuantitativos discontinuos. Representan cualidades que son expresables sólo por números enteros.

Por lo tanto para el caso de datos multiestados cualitativos sin secuencia lógica, no se puede establecer un orden, las cuales se consideran como independientes una de las otras, no existiendo así, mayor o menor similitud genética entre las variedades.

Es el caso de algunas características morfológicas cualitativas (forma del folíolo, color de flor, color de pubescencia, brillo del tegumento y test de peroxidasa del tegumento), y los datos moleculares (RAPD, AFLP y SSR), los cuales se ingresaron, como datos excluyentes o sea “están o no presentes”.

Un ejemplo del análisis de datos obtenidos entre dos genotipos (OTUs) *x* e *y* (9 variables) es el siguiente:

BANDAS		1	2	3	4	5	6	7	8	9
GENOTIPOS	<i>X</i>	0	0	1	1	0	1	1	0	1
	(OTUs)									
	<i>Y</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	1

Las restantes características morfológicas cualitativas, son datos multiestados cualitativos con secuencia lógica.

Es el caso de caracteres cualitativos que pueden ser ordenados en una secuencia de magnitud de la cualidad estudiada o también llamado código aditivo (Sneath y Sokal, 1973). Los mismos se transformaron en caracteres del tipo “presencia/ausencia”.

Un ejemplo de este tipo de análisis lo muestra la característica, “tipo de crecimiento del tallo”, con tres variables: “determinado”, “semi-determinado” e “indeterminado”. Suponemos tres genotipos

(OTUs), X, Y y Z. El análisis consiste en que cada vez que la variable “determinado” está presente se considera que las otras dos variables también lo están, o sea que se asume la presencia de “semi-determinado” e “indeterminado”. Cuando la variable presente es “semi-determinado” conlleva a la presencia de “indeterminado”. Y cuando ésta última es la presente, sólo el genotipo de variable “indeterminado” lleva el valor de presencia, (1). Esto se observa en el siguiente cuadro que ilustra el análisis de la característica, “crecimiento del tallo”:

Variables	determinada	semi-determinada	indeterminada
OTUs			
Genotipo X	0	0	1
Genotipo Y	0	1	1
Genotipo Z	1	1	1

En el caso de la característica cuantitativa, “peso de 1000 granos”, los datos se expresan en números enteros o discontinuos.

En este contexto, los resultados numéricos fueron transformados en caracteres de expresión binaria (doble-estado), como si fueran características del tipo cualitativo, subdividiéndolos en intervalos y atribuyendo a los intervalos la característica presencia/ausencia, (1) ó (0), respectivamente.

La selección de los intervalos se realizó, utilizando la fórmula siguiente (Sokal y Rohlf, 1970):

Windows (versión 3,0), realizando una distribución de frecuencia.

En la **Figura 5**, se observa la distribución de frecuencias de los datos de “peso de 1000 semillas” en el eje Y. En el eje X se determina los intervalos que se utilizaron para transformar la característica de tipo cuantitativa en una de tipo cualitativa.

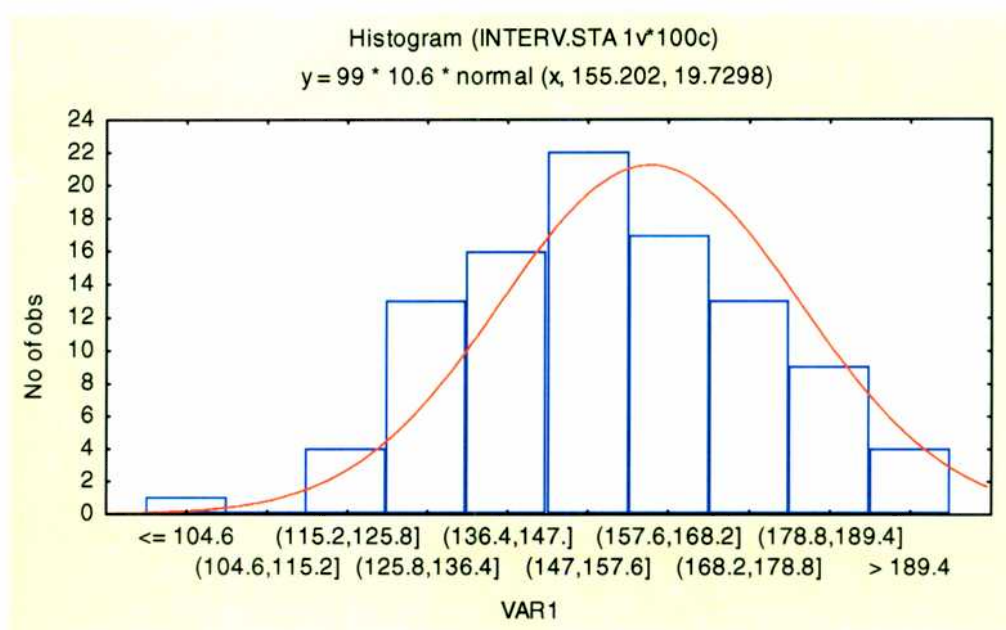


Fig.5 Histograma de datos de “peso de 1000 granos”. Los intervalos considerados, fueron los que aparecen en el eje X del histograma, el eje Y representa la frecuencia del número de observaciones medidas para las 100 variedades argentinas de soja

De acuerdo al análisis explicado se ingresaron todos los datos en forma de doble-estado (presencia/ausencia) en la MBD, se construyó una matriz con los datos de las características morfológicas y una para cada tipo de marcador molecular (RAPD, AFLP y SST), según lo

De acuerdo al análisis explicado se ingresaron todos los datos en forma de doble-estado (presencia/ausencia) en la MBD, se construyó una matriz con los datos de las características morfológicas y una para cada tipo de marcador molecular (RAPD, AFLP y SST), según lo descripto por Crisci (1983).

Posteriormente se calcularon los índices de contenido polimórfico (PIC, "Polymorphic Index Content) para cada marcador de acuerdo a lo descripto por Powell y Rafalski *et al.* (1996) y Milbourne *et al.*, (1997). Para cada *locus* se calculó el índice de contenido polimórfico, utilizando el algoritmo:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i th.

El PIC estima el poder de discriminación de un *locus*, no sólo por el número de alelos que se expresan, sino por la frecuencia relativa de aparición de los alelos. El rango de los valores del PIC es entre 0 (monomórfico) a 1 (altamente discriminativo, con muchos alelos en igual frecuencia) (Botstein *et al.*, 1980; Keim *et al.*, 1992).

En el caso de los marcadores RAPD y AFLP (técnicas que generan marcadores genéticamente dominantes), cada alelo individual fue considerado como un simple *locus*, donde:

$$PIC = 1 - \sum p_g^2$$

p_g es la frecuencia de un genotipo individual.

Se calculó el promedio de PIC para cada técnica, con el fin de comparar y determinar el grado de polimorfismo revelado por cada tipo de marcador.

7.2.2 Cálculo de distancias genéticas

Se calcularon las distancias genéticas entre las variedades de soja, utilizando el programa NTSYS-PC versión 1.8 del “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System”.

Para la elección del coeficiente de similitud utilizado, existen antecedentes donde se sabe que está supeditado al tipo de datos que contiene la MBD (Crisci, 1983). Se ha demostrado empíricamente (Sneath y Sokal, 1973), que en aquellos estudios en los cuales predominan los caracteres doble-estado, conviene transformar mediante codificación, los datos multiestados restantes en datos doble-estado y utilizar coeficientes de asociación. Por ésta razón se seleccionó el coeficiente de asociación de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973). Es uno de los más utilizados para estos estudios, donde no se consideran caracteres en los cuales el mismo estado está ausente en ambas OTUs (0,0).

El coeficiente se expresa:

$$CAJ = a / a+b+c$$

Donde :

a: es el número de caracteres en los cuales el mismo estado es compartido por ambas OTUs (1,1).

b: es el número de caracteres en los cuales un estado es poseído por la primera OTU, pero no por la segunda (1,0).

c: es el número de caracteres en los cuales está ausente en la primer OTU, pero presente en la segunda (0,1).

Los valores de similitud obtenidos a partir de la aplicación de este coeficiente varía entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud).

7.2.3 Relación genética por análisis de dendrograma

Se realizó el estudio de las matrices de similitud (Sneath y Sokal, 1973) a fin de sintetizar la información de las mismas permitiendo el reconocimiento de las relaciones entre la totalidad de las OTUs (variedades). La técnica utilizada en este trabajo es la llamada “análisis de clusters” o “análisis de agrupamiento”.

Se utilizó el sistema de la media aritmética no ponderada, UPGMA (Rohlf, F.J., 1992), siendo una de la técnicas más utilizadas en el método de “ligamiento promedio”.

El resultado de éste análisis, se representó en forma de diagrama arborescente o dendrograma, que muestra la relación en grados de similitud entre dos variedades o grupos de variedades.

La interpretación de los dendrogramas se basó en reconocer primero los grandes grupos, es decir los que se han originado a bajos niveles de similitud. Luego se analizaron dichos grupos separándolos en subgrupos, conjuntos y subconjuntos hasta llegar a los núcleos que representan la máxima similitud hallada en los organismos de estudio.

Las técnicas que se utilizan para la construcción de los dendrograma, no reflejan en forma exacta la información de la matriz de similitud, ya que se producen distorsiones de las relaciones de las mismas al realizar una representación bidimensional. Por esta razón se construyó una nueva matriz a partir de los datos del dendrograma para cada sistema analizado, denominándolas matrices cofenéticas.

Se calculó el coeficiente de correlación entre las matrices de cada sistema (RAPD, AFLP, SSR y características morfológicas) utilizando el “Test de correspondencia de matrices de Mantel” (Rohlf, F.J., 1962), lo que permite observar la relación o concordancia entre los distintos métodos utilizados.

Para las matrices cofenéticas también se calcularon los coeficientes, utilizando el mismo test de correspondencia.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN SOJA BASÁNDOSE EN LA COMPARACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS TRADICIONALES

Con el objeto de realizar un estudio de la factibilidad y validez de los distintos tipos de marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética existente en soja, es necesario compararlos con los resultados obtenidos con descriptores tradicionalmente usados para este fin.

Según las recomendaciones establecidas (TG/80/3, Guidelines for the Conduct of Test for Distinctness, Homogeneity and Satbility) por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV), las características más estables a ser utilizadas son: color de pubescencia, color de flor, color del hilo y grupo de madurez. Pero debido a la gran cantidad de variedades existentes en países como la Argentina, Brasil y los EUA y a la gran relación genética entre las variedades, no resulta posible lograr una diferenciación sólo con estas cuatro características.

Para realizar una comparación exhaustiva entre los materiales desde el punto de vista morfológico, primeramente se consideró el grupo de ocho características cualitativas básicas para la taxonomía intraespecífica de *Glycine max*, según las normas de utilización en el Registro de Propiedad de Cultivares (INASE).

En condiciones normales de inscripción de una variedad, si luego del análisis de las 8 características morfológicas no es posible diferenciarlas del resto existente, se solicita mayor información al solicitante.

En este contexto, se analizaron otras 8 características más para así obtener una separación taxonómica completa de las 100 variedades de soja y poder compararla con lo obtenido con marcadores moleculares. Algunas de estas características se corresponden a las del sistema que se aplica en Argentina y otras al de los EUA.

Se obtuvo así el “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de características morfológicas, fisiológicas y fenológicas.

Para ello, se realizó un ensayo a campo de las 100 variedades de soja. Las 16 características fueron:

1. Tipo de crecimiento de la planta
2. Tipo de planta
3. Color de pubescencia
4. Forma del folíolo
5. Color de la flor
6. Reacción al test de peroxidasa
7. Color del hilo de la semilla
8. Grupo de maduración
9. Color de la vaina

10. Tonalidad del fruto
11. Color de hoja
12. Color del hipocótilo
13. Tono de pubescencia
14. Brillo del tegumento
15. Forma de la semilla
16. Peso de 1000 semillas

Algunas de estas características fueron evaluadas a campo, como color de pubescencia, forma del folíolo, color de flor, color de hoja, color de vaina, tonalidad del fruto y tono de pubescencia.

Otras fueron analizadas en el laboratorio como peso de 1000 semillas, forma de la semilla, color del hilo de la semilla y test de peroxidasa.

Los restantes datos se obtuvieron del Registro Nacional de Cultivares (INASE), de acuerdo a lo declarado por los solicitantes (ver Materiales y Métodos, punto 2). Todos los datos obtenidos fueron corroborados con el archivo de datos presentes en el INASE.

En la **Tabla II**, se resume los resultados con los que se logró la separación de las 100 variedades de soja estudiadas.

Tabla II: “Documento de Identidad Genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, determinado por características morfológicas. Los códigos son los especificados luego de la tabla. El valor (0) en el cuadro significa no determinado.

Características morfológicas	PLTIP CRECI	PLAN TIPO	PUB COLOR	HOJA FORFOL	INFLO COLO	SEMPE ROTEG	SEMHIL COLO	GRUPO MADUR
Variedades								
A-7986	1	5	1	0	2	1	6	10
RA 702	1	1	2	3	1	1	7	9
A 5409	3	1	1	3	2	3	2	8
A 6404	1	5	1	0	2	1	3	9
NS-641	1	5	2	3	2	3	7	9
A-5401	1	9	1	0	2	3	3	8
D. MARIO 49	3	5	1	2	2	1	2	7
HOOD 75	1	9	1	3	2	1	2	9
RA 587	1	1	1	3	2	1	2	8
TORCAZA 63	1	0	2	1	1	3	7	9
A 6381	1	1	1	3	2	3	6	9
A 4702	3	9	2	0	2	1	7	7
OFPEC VEN.	1	9	1	1	2	3	2	9
NS-642	1	1	2	2	2	3	6	9
TORCACI 58	1	9	1	1	2	1	2	8
A-4656	3	1	2	3	1	1	7	7
A-5308	1	1	1	3	2	1	2	8
AVUT. 64	1	1	2	3	1	1	7	9
D. MARIO 43	3	5	2	3	2	1	3	7
FED. 1 INTA	1	9	1	3	2	1	2	9
CHARATA 76	1	5	2	3	1	1	7	10
FA-841 INTA	1	9	2	0	1	3	7	11
A-4422	3	5	2	4	1	3	7	7
PROMAX 550	2	5	2	3	2	1	7	8
GOLOND. 65	2	1	1	2	2	1	2	9
BRAGG	1	5	2	3	1	3	7	10
TJ S 2000	1	5	2	3	1	3	7	8
TACUA INTA	1	5	1	3	1	3	1	8
DEK CX 458	3	5	2	3	1	3	6	7
COKER 237	1	9	2	2	1	3	7	10
FA-940 INTA	1	1	2	2	2	1	2	12
DEK CX 690	1	1	1	3	1	1	2	9
A-6443	1	1	1	4	2	3	2	9
D. MARIO 57	1	1	1	3	1	3	2	8
A-3910	3	5	2	0	1	1	7	6
D. MARIO 50	3	1	1	3	2	3	2	8
MENE. INTA	1	1	2	3	2	1	3	12
M. NAIR 800	1	9	1	0	1	1	2	10
OFPEC SANT	1	1	1	3	2	1	2	8
MARTIN. 50	1	1	2	1	2	3	3	8
MONTER. 74	1	0	1	3	2	1	3	10
FA-837 INTA	1	1	1	3	1	1	2	11
TJS 2020	1	9	2	3	1	1	7	9
D. FLOR 58	1	9	1	2	2	1	3	8
DORADA 48	3	1	2	3	2	1	3	7
A-7894	1	5	1	3	1	1	3	10

DEK CX 740	1	9	2	2	2	3	7	10
OFPEC PUNT	1	5	1	3	2	1	2	9
TUC-G-16	1	1	1	3	2	1	0	11
REINA 52	1	5	1	2	2	1	2	8
FORREST	1	9	2	3	1	1	7	8
PLAYER. 53	1	5	1	2	2	3	2	8
BATARA 54	1	5	1	3	1	3	2	8
TJ S 2043	3	9	2	3	2	1	2	7
A-5780	1	9	2	3	1	1	7	8
OFPEC RJFE	1	9	2	2	1	1	3	9
ACA 731	1	1	2	3	1	0	3	10
A-7372	1	9	2	3	1	3	7	10
A-3205	3	5	2	3	2	3	3	6
D.MARIO 55	1	1	2	3	2	1	7	8
9442	3	5	2	3	2	3	7	7
CARM. INTA	3	1	2	3	1	1	2	6
GRAN. 73	1	9	2	2	2	3	7	10
COBR. FCA	1	9	2	3	2	1	3	10
OFPEC NORT	1	5	1	3	2	3	3	8
OFPEC CORD	1	1	1	3	1	1	2	9
9501	3	5	2	3	1	0	7	8
ORO FCA	1	9	1	3	2	1	3	9
CAMIN. 32	3	5	2	3	2	1	7	6
F. CAS. INTA	1	5	1	1	2	1	2	7
RAMSON	1	9	2	3	2	3	7	10
H. FA INTA	3	5	2	2	1	0	2	7
CARCA. INTA	1	9	1	3	1	3	3	9
CO. FA INTA	1	5	1	3	2	1	2	8
CE FA INTA	1	5	2	2	2	1	7	10
TANC. INTA	1	1	1	3	2	1	6	9
COPET. 53	1	0	1	1	2	3	3	8
FA-701 INTA	1	9	2	3	1	3	3	10
SEMIT 500	1	9	1	3	1	3	3	8
A-7306	1	1	1	3	2	3	6	10
TIJER. 42	3	1	2	3	1	1	7	7
TJS 2065	1	9	1	3	2	3	2	9
RO-FA INTA	1	5	2	3	1	1	7	8
NS-555	1	1	1	2	2	3	3	8
COLOR. 37	3	9	2	3	2	1	7	6
CALAND. 55	1	5	1	2	1	1	2	8
FT-11 ALVOR	1	5	2	1	2	1	7	12
D. MARIO 48	3	1	2	3	2	1	7	7
ACA 571	1	1	1	3	1	3	1	8
D. EDU 375	3	5	2	3	1	0	7	6
ACA 681	1	1	2	3	1	0	3	9
OFPEC R.627	3	9	2	2	1	3	7	9
TRESUR 321	3	9	2	3	1	1	3	6
PRIMAV. 100	3	1	2	4	1	0	6	7
MAXI. 601	1	9	1	0	2	1	2	9
TRESUR 455	3	9	2	3	1	3	7	7
OFPEC ENTR	1	9	2	1	2	3	3	10
PROMAX 530	3	5	1	3	1	1	3	8
D. EDU 510	1	5	2	2	2	1	7	8
WILLIAMS	3	9	2	3	1	1	7	6

Características morfológicas	FRUTO COLOR	FRUTO TONAL	HOJA COLOR	PLUCOL HIPO	PUB TONO	SEMBRI LTEG	SEMI FORMA	SEMI PESO
Variedades								
A-7986	1	0	5	1	0	2	1	145g
RA 702	1	9	5	2	5	1	2	139g
A 5409	3	5	5	3	1	1	2	159g
A 6404	3	1	7	3	1	1	1	160g
NS-641	3	5	7	3	5	2	1	144g
A-5401	3	5	7	3	1	1	1	145g
D. MARIO 49	1	1	5	3	5	1	2	184g
HOOD 75	1	0	0	0	0	1	0	140g
RA 587	1	1	5	1	1	1	2	132g
TORCAZA 63	1	9	7	1	9	0	3	126g
A 6381	1	5	7	4	1	2	1	128g
A 4702	3	5	3	3	9	1	1	190g
OFPEC VEN.	3	5	7	3	1	1	1	177g
NS-642	3	5	5	3	5	1	2	175g
TORCACI 58	3	5	5	3	1	1	1	152g
A-4656	1	1	3	1	5	1	1	163g
A-5308	3	5	7	0	5	0	1	125g
AVUT. 64	3	5	5	1	5	0	2	127g
D. MARIO 43	1	5	5	1	5	1	1	175g
FED. 1 INTA	1	5	5	4	1	1	1	151g
CHARATA 76	3	9	5	1	1	1	1	155g
FA-841 INTA	3	5	5	1	5	2	2	137g
A-4422	1	5	5	1	5	1	1	148g
PROMAX 550	3	9	5	3	9	2	1	156g
GOLOND. 65	3	5	5	3	1	1	2	176g
BRAGG	1	0	3	0	0	2	1	165g
TJ S 2000	3	5	5	1	5	1	1	168g
TACUA INTA	3	5	5	1	1	1	2	146g
DEK CX 458	3	1	5	1	5	1	2	174g
COKER 237	1	5	7	1	1	2	1	161g
FA-940 INTA	3	5	3	3	9	2	2	126g
DEK CX 690	3	1	7	1	1	2	2	155g
A-6443	3	1	7	3	1	2	1	150g
D. MARIO 57	1	1	3	1	1	1	1	130g
A-3910	1	5	3	1	5	1	2	165g
D. MARIO 50	1	1	7	4	1	1	1	197g
MENE. INTA	3	9	5	3	9	0	2	130g
M. NAIR 800	1	0	5	1	5	2	1	128g
OFPEC SANT	4	5	5	3	5	2	1	155g
MARTIN. 50	3	5	7	3	5	0	2	140g
MONTER. 74	1	0	7	3	5	0	2	165g
FA-837 INTA	1	5	7	1	1	1	2	147g
TJ S 2020	1	9	7	1	9	1	4	133g
D. FLOR 58	3	5	5	3	5	1	2	152g
DORADA 48	3	9	7	3	5	2	1	142g
A-7894	1	1	5	2	5	0	1	175g
DEK CX 740	1	5	5	3	1	2	2	185g
OFPEC PUNT	4	1	5	3	5	2	1	140g
TUC-G-16	4	9	7	3	1	0	2	183g

REINA 52	4	5	5	3	1	1	1	142g
FORREST	1	0	5	0	0	2	1	146g
PLAYER. 53	3	5	5	3	5	1	2	125g
BATARA 54	1	9	5	1	9	1	1	135g
TJS 2043	4	5	7	3	5	1	1	150g
A-5780	3	5	5	1	5	1	2	150g
OFPEC RJFE	1	5	5	1	5	0	2	155g
ACA 731	3	9	7	1	9	2	1	150g
A-7372	1	5	5	1	5	2	1	166g
A-3205	3	0	7	4	0	1	0	180g
D.MARIO 55	1	5	5	1	5	2	1	140g
9442	1	5	7	3	5	2	2	148g
CARM. INTA	3	5	5	1	5	1	2	160g
GRAN. 73	3	5	5	3	9	2	2	162g
COBR. FCA	1	9	5	3	9	2	2	125g
OFPEC NORT	3	5	5	3	9	2	3	125g
OFPEC CORD	3	1	5	1	1	2	1	130g
9501	1	5	5	2	5	0	2	195g
ORO FCA	1	1	5	4	5	1	1	179g
CAMIN. 32	3	5	3	3	5	1	2	172g
F. CAS. INTA	3	1	7	3	1	1	2	175g
RAMSON	1	0	5	0	0	2	1	170g
H. FA INTA	3	5	7	1	1	1	2	200g
CARCA. INTA	3	1	5	1	5	0	1	145g
CO. FA INTA	3	1	5	3	5	1	2	150g
CE FA INTA	3	5	5	2	5	2	2	145g
TANC. INTA	1	5	7	4	0	1	2	168g
COPET. 53	1	0	7	3	5	0	1	131g
FA-701 INTA	3	5	5	1	5	1	2	175g
SEMIT 500	3	1	3	3	5	2	1	162g
A-7306	3	1	7	2	1	2	1	152g
TIJER. 42	3	5	5	1	5	0	2	187g
TJ S 2065	4	9	3	3	5	1	1	170g
RO-FA INTA	3	9	5	1	5	2	2	164g
NS-555	4	5	7	3	5	1	2	94g
COLOR. 37	3	5	5	3	5	2	2	152g
CALAND. 55	3	1	5	1	1	1	2	186g
FT-11 ALVOR	3	9	5	3	9	2	1	128g
D. MARIO 48	3	5	5	3	1	1	1	155g
ACA 571	4	5	7	1	1	2	1	155g
D. EDU 375	1	5	5	1	9	2	2	180g
ACA 681	3	9	7	1	1	2	1	150g
OFPEC R.627	1	5	3	0	5	0	2	166g
TRESUR 321	3	9	7	1	5	2	1	160g
PRIMAV. 100	3	1	5	1	1	2	2	169g
MAXI. 601	4	1	5	1	1	2	2	181g
TRESUR 455	1	9	7	1	9	1	1	170g
OFPEC ENTR	3	5	5	3	5	2	2	150g
PROMAX 530	3	1	5	1	5	2	2	154g
D. EDU 510	3	5	5	2	5	1	1	165g
WILLIAMS	1	0	5	2	0	2	1	0

Los datos tienen el siguiente código para cada una de las características morfológicas (el mismo utilizado en el INASE):

Planta: Tipo de crecimiento del tallo (PLTIPCRECI)

- 1: Determinado
- 2: Semideterminado
- 3: Intedeterminado

Planta: Tipo de planta (PLANTIPO)

- 1: Sin ramificación
- 5: Intermedio
- 9: Ramificada

Pubescencia: color (PUBCOLOR)

- 1: Gris
- 2: Castaño

Hoja: Forma del folíolo (HOJAFORFOL)

- 1: Lanceolado
- 2: Oblongo
- 3: Oval
- 4: Elíptica

Inflorescencia: Color de la flor (INFLOCOLO)

1: Blanca

2: Violeta

Semilla: Test de peroxidasa del tegumento (SEMPEROTEG)

1: Positivo

3: Negativo

Semilla: Color del hilo (SEMHILCOLO)

1: Amarillo

2: Castaño claro

3: Castaño oscuro

5: Gris

6: Negro imperfecto

7: Negro

8: Otros

Datos fenológicos: Grupo de maduración, según escala americana (GRUPOMADUR)

1: 000

2: 00

3: 0

4: I

5: II

6: III

7: IV

8: V

9: VI

10: VII

11: VIII

12: IX

13: X

Fruto: Color de la vaina (FRUTOCOLOR)

1: Tostado

2: Negro

3: Castaño

4: Gris

Fruto: Tonalidad (FRUTOTONAL)

1: Clara

5: Intermedia

9: Oscura

Hoja: Color (HOJACOLOR)

3: Verde claro

5: Verde intermedio

7: Verde oscuro

Plántula: Color del hipocótilo (PLUCOLHIPO)

- 1: Verde
- 2: Verde claro
- 3: Púrpura
- 4: Púrpura intenso

Pubescencia: Tono (PUBTONO)

- 1: Clara
- 5: Intermedia
- 9: Oscura

Semilla: Brillo del tegumento (SEMBRILTEG)

- 1: Opaco
- 2: Brillante

Semilla: Forma (SEMIFORMA)

- 1: Esférica
- 2: Esférica achatada
- 3: Alargada
- 4: Alargada achatada

Semilla: Peso de 1000 semillas (SEMIPESO)

2. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN SOJA BASÁNDOSE EN MARCADORES MOLECULARES

2.1 Obtención del “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de RAPD

2.1.1 Determinación de “primers” informativos

Para la evaluación y caracterización de la variabilidad genética existente entre variedades de soja, cuantificar su grado de parentesco y obtener así una “huella digital” genotípica para cada variedad con marcadores RAPD, el primer paso consistió en identificar “primers diagnósticos” que revelen polimorfismos en los patrones electroforéticos de bandas amplificadas. Para esto se amplificaron los ADNs genómicos de 10 variedades caracterizadas como poco relacionadas entre sí, sobre la base de informaciones obtenidas a partir de características morfológicas y de pedigrí.

Se chequearon 70 “primers” de 10 pb de longitud (“kits” X, Y, A y C; OPERON Technologies, EUA), con las 10 variedades anteriormente mencionadas. De los 70 “primers”, se produjo un total de 320 productos claramente visibles (con un promedio de 4.6 bandas por ensayo) de los cuales el 9.7% (31 bandas) fueron polimórficas.

Una vez determinados los “primers” informativos, se procedió a amplificar los ADNs genómicos de las 100 variedades argentinas y se estudió el polimorfismo existente entre todas las variedades.

De los 22 “primers” informativos seleccionados, se generó un total de 160 productos de amplificación claramente visibles (con un promedio de 5.16 bandas por ensayo) de los cuales el 19.3% (31 bandas) fueron polimórficas.

Al ser los RAPD marcadores de visualización dominante, se cuantificó el tamaño de los fragmentos polimórficos, en pares de bases, comparando con un marcador de peso molecular y se computó la presencia o ausencia de la banda para cada variedad.

La **Tabla III**, indica los “primers” utilizados con el respectivo resultado.

Tabla III: Determinación de “primers” informativos para la utilización de RAPD en la identificación de variedades de soja. Se muestran los resultados de las amplificaciones de los “primers” ensayados. Los nombres de los “primers” son los sugeridos por el proveedor (OPERON Technologies, EUA): OP = OPERON; X; Y, A, C = “kits” X, Y, A, C y el número deriva del homónimo de cada “kit”. Código del “primer”: Secuencia 5’ a 3’. Resultado: Número de Marcadores polimórficos.

Código del primer	Secuencia 5’ a 3’	Resultado	Número de Marcadores polimórficos
OPX-01	CTGGGCACGA	Polimórfico	1
OPX-02	TTCCGCCACC	Polimórfico	1
OPX-03	TGGCGCAGTG	Polimórfico	1
OPX-04	CCGCTACCGA	No amplificó	---
OPX-05	CCTTTCCTC	Polimórfico	1
OPX-06	ACGCCAGAGG	Monomórfico	---
OPX-07	GAGCGAGGCT	Polimórfico	1
OPX-08	CAGGGGTGGA	Polimórfico	1
OPX-09	GGTCTGGTTG	No amplificó	---
OPX-10	CCCTAGACTG	No amplificó	---
OPX-11	GGAGCCTCAG	No amplificó	---
OPX-12	TCGCCAGCCA	Monomórfico	---
OPX-13	ACGGGAGCAA	Monomórfico	---
OPX-14	ACAGGTGCTG	No amplificó	---
OPX-15	CAGACAAGCC	No amplificó	---
OPX-16	CTCTGTTCGG	Monomórfico	---

OPX-17	GACACGGACC	Monomórfico	---
OPX-18	GACTAGGTGG	Monomórfico	---
OPX-19	TGGCAAGGCA	No amplificó	---
OPX-20	CCCAGCTAGA	No amplificó	---
OPY-01	GTGGCATCTC	Monomórfico	---
OPY-02	CATCGCCGCA	Monomórfico	---
OPY-03	ACAGCCTGCT	Polimórfico	1
OPY-04	GGCTGCAATG	Polimórfico	1
OPY-05	GGCTGCGACA	Polimórfico	3
OPY-06	AAGGCTCACC	Polimórfico	1
OPY-07	AGAGCCGTCA	No amplificó	---
OPY-08	AGGCAGAGCA	Polimórfico	1
OPY-09	AGCAGCGCAC	Polimórfico	1
OPY-10	CAAACGTGGG	Monomórfico	---
OPY-11	AGACGATGGG	No amplificó	---
OPY-12	AAGCCTGCGA	No amplificó	---
OPY-13	GGGTCTCGGT	Polimórfico	1
OPY-14	GGTCGATCTG	Monomórfico	---
OPY-15	AGTCGCCCTT	Monomórfico	---
OPY-16	GGGCCAATGT	Monomórfico	---
OPY-17	GACGTGGTGA	No amplificó	---
OPY-18	GTGGAGTCAG	Polimórfico	1
OPY-19	TGAGGGTCCC	Monomórfico	---

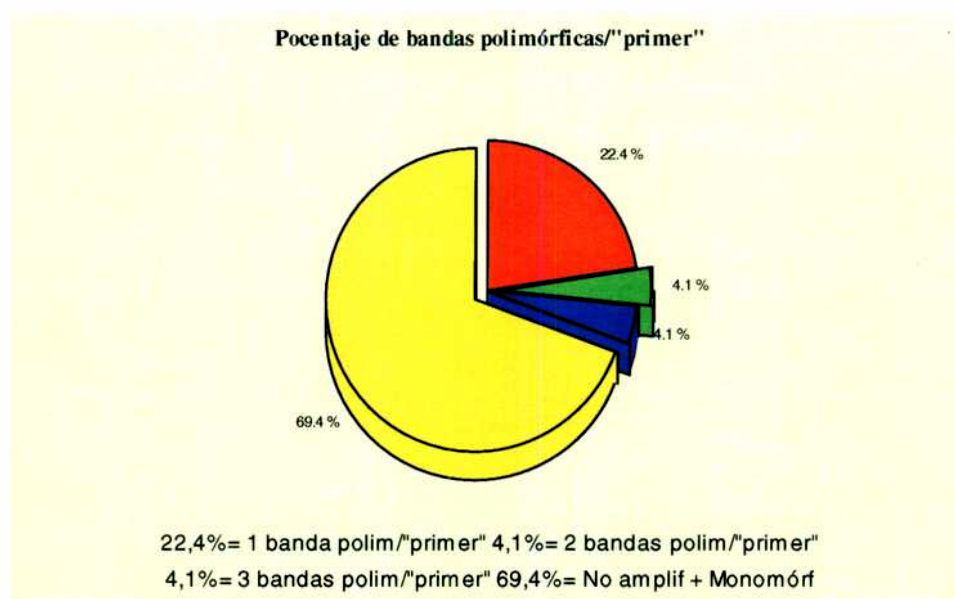
OPY-20	AGCCGTGGAA	Monomórfico	---
OPA-01	CAGGCCCTTC	Monomórfico	---
OPA-02	TGCCGAGCTG	Polimórfico	1
OPA-03	AGTCAGCCAC	No amplificó	---
OPA-04	AATCGGGCTG	Polimórfico	3
OPA-05	AGGGGTCTTG	Polimórfico	1
OPA-06	GGTCCCTGAC	Monomórfico	---
OPA-07	GAAACGGGTG	No amplificó	---
OPA-08	GTGACGTAGG	No amplificó	---
OPA-09	GGGTAACGCC	No amplificó	---
OPA-10	GTGATCGCAG	No amplificó	---
OPA-11	CAATCGCCGT	No amplificó	---
OPA-12	TCGGCGATAG	Monomórfico	---
OPA-13	CAGCACCCAC	Monomórfico	---
OPA-14	TCTGTGCTGG	No amplificó	---
OPA-15	TTCCGAACCC	Monomórfico	---
OPA-16	AGCCAGCGAA	Monomórfico	---
OPA-17	GACCGCTTGT	Monomórfico	---
OPA-18	AGGTGACCGT	Polimórfico	1
OPA-19	CAAACGTCCG	Polimórfico	2
OPA-20	GTTGCGATCC	No amplificó	---
OPC-01	TTCGAGCCAG	No amplificó	---
OPC-02	GTGAGGCGTC	No amplificó	---

OPC-03	GGGGGTCTTT	No amplificó	---
OPC-04	CCGCATCTAC	No amplificó	---
OPC-05	GATGACCGCC	Polimórfico	3
OPC-06	GAACGGACTC	Monomórfico	---
OPC-07	GTCCCGACGA	Polimórfico	2
OPC-08	TGGACCGGTG	Polimórfico	2
OPC-09	CTCACCGTCC	No amplificó	---
OPC-10	TGTCTGGGTG	No amplificó	---

De lo observado en la **Tabla III**, el grado de polimorfismo encontrado por “primers” resultó ser relativamente bajo. Sobre un total de 70 “primers” analizados, los porcentajes encontrados fueron los siguientes:

- 9.7% de bandas polimórficas sobre bandas totales
- 69.4% corresponde a “primers” que no amplificaron o que se presentaron como monomórficos.
- 22.4% corresponde a “primers” que presentan sólo un marcador polimórfico.
- 4.1% corresponde a “primers” que presentan 2 marcadores polimórficos.
- 4.1% corresponde a “primers” que presentan 3 marcadores polimórficos.

Numéricamente de los 70 “primers” analizados, sólo 22 fueron capaces de evidenciar polimorfismo, los cuales fueron utilizados como diagnóstico para obtener una identificación o “huella digital genotípica” de las 100 variedades de soja. El resultado se representa en el siguiente gráfico de torta:



Los 22 “primers” capaces de evidenciar polimorfismos RAPD, generaron 31 marcadores polimórficos (1.4 marcador/“primer”).

En la **Figura 6**, se muestra a modo de ejemplo, los patrones de 30 variedades, después de la amplificación del ADN genómico de cada variedad con el “primer” OPY-05, que fue uno de los que reveló mayor grado de polimorfismo.

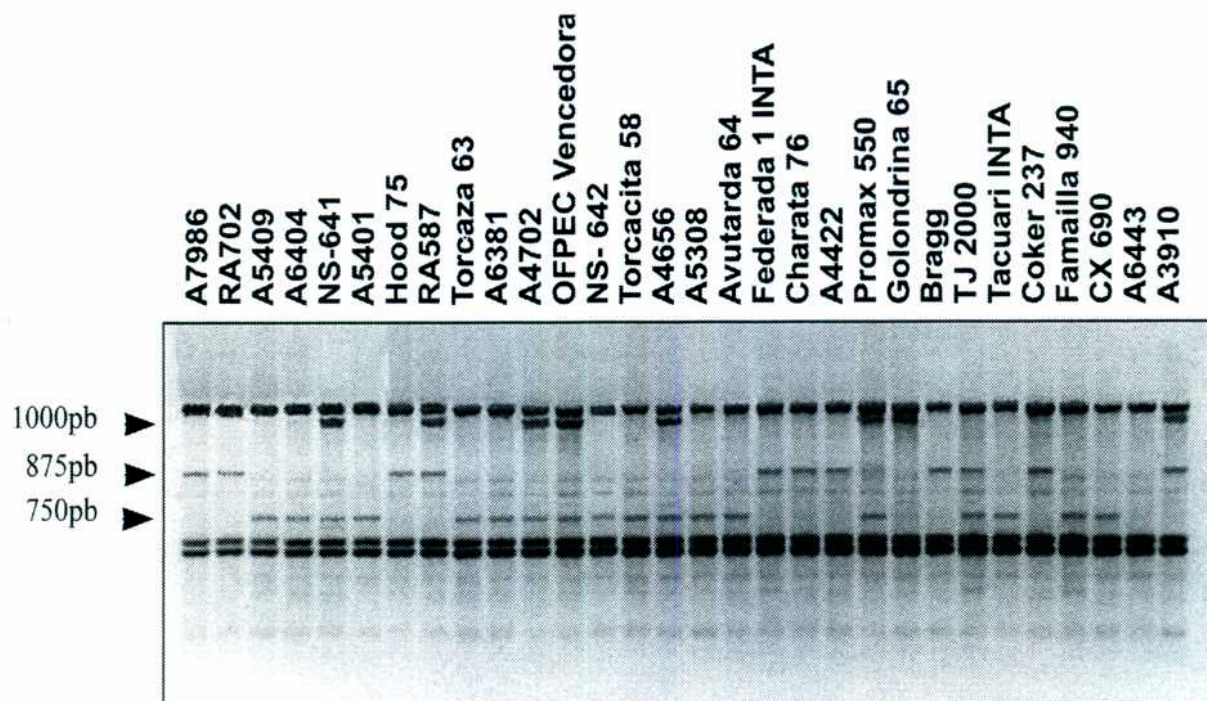


Fig. 6 Representación de un patrón RAPD utilizando el “primer” OPY-05 en 30 variedades de soja. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (1,5% TAE 1x) y teñidos con EtBr. Se detectaron tres bandas polimórficas (marcadores). Las flechas indican los 3 marcadores y sus respectivas longitudes en pares de bases (pb).

2.1.2 “Documento de Identidad Genético” de 100 variedades de soja con propiedad en Argentina, determinado por RAPD.

Luego de la determinación de los “primers” informativos, se amplificaron los ADNs genómicos de las 100 variedades de soja. Se estudió el polimorfismo existente entre todas las variedades y se cuantificó el tamaño de los fragmentos polimórficos, en pares de bases.

El resultado de este trabajo se observa en la **Tabla IV**, donde se determina el “documento de identidad genético” para cada variedad, por marcadores RAPD.

Tabla IV: “Documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina. Se especifica el nombre de los “primers”, su respectivo índice de contenido polimórfico (PIC) y el tamaño de las bandas en pares de bases (pb). Contiguo al nombre de cada “primer” se especifica el marcador encontrado en pares de bases. Los códigos, (1) corresponden a presencia de la banda, (0) ausencia de la banda y (5) no encontrado, luego de realizar tres repeticiones, con el fin de establecer la presencia/ausencia de la misma.

"Primers"	OPX-01	OPX-02	OPX-03	OPX-05	OPX-07	OPX-08	OPY-03	OPY-04	OPY-05
PICs	0,5	0,2	0,48	0,32	0,5	0,45	0,3	0,31	0,5
Banda en pb	900	750	500	600	800	450	600	650	850
Variedades									
A-7986	1	1	1	0	1	0	1	1	1
RA 702	0	1	0	0	1	1	1	1	1
A 5409	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A 6404	1	0	1	0	1	0	1	1	0
NS-641	0	0	0	0	1	0	5	1	0
A-5401	0	0	0	0	0	0	1	1	0
D. MARIO 49	5	5	0	0	0	0	1	1	0
HOOD 75	0	0	1	1	1	0	5	1	1
RA 587	1	0	1	0	1	0	1	1	1
TORCAZA 63	0	0	0	0	0	0	1	1	0
A 6381	1	0	1	0	0	0	5	1	0
A 4702	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC VEN.	1	0	1	0	0	0	1	1	0
NS-642	1	0	0	0	0	1	1	1	5
TORCAZA 58	0	0	1	0	0	0	1	1	0
A-4656	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-5308	1	0	0	0	0	0	0	1	0
AVUT. 64	1	0	0	0	0	1	5	1	0
D. MARIO 43	5	5	0	0	1	0	1	0	1
FED. 1 INTA	1	0	1	0	1	1	1	1	1
CHARATA 76	0	0	0	0	1	0	1	1	1
FA-841 INTA	5	5	0	0	0	1	1	1	0
A-4422	1	0	1	0	1	0	1	0	1
PROMAX 550	1	0	0	0	1	1	1	1	1
GOLOND. 65	0	0	0	0	0	0	1	1	0
BRAGG	1	0	0	0	1	1	1	1	1
TJ 2000	0	0	1	0	1	1	1	1	1
TACUA INTA	0	1	1	1	0	0	1	1	0
DEK CX 458	0	5	1	0	1	0	1	0	1
COKER 237	0	1	0	0	1	0	1	1	1
FA-940 INTA	1	1	0	0	0	0	5	1	0
DEK CX 690	1	0	0	0	0	0	1	1	0
A-6443	1	0	0	0	5	1	1	1	0
D. MARIO 57	1	5	0	1	0	0	1	1	0
A-3910	1	0	1	0	0	0	5	5	1
D. MARIO 50	5	0	0	0	1	0	1	1	0
MENE. INTA	0	0	0	0	0	0	1	1	0
M. NAIR 800	0	0	1	0	0	0	1	1	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	0	0	1	0
MARTIN. 50	1	0	1	0	0	0	1	0	1

MONTER. 74	0	0	1	1	1	1	1	1	1
FA-837 INTA	0	0	1	5	1	1	1	1	1
TJS 2020	0	0	1	0	1	1	1	1	1
D. FLOR 58	0	0	1	1	1	0	1	1	1
DORADA 48	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A-7894	0	0	1	0	1	0	1	1	1
DEK CX 740	1	1	1	0	0	1	5	1	0
OFPEC PUNT	0	0	0	1	1	0	1	1	1
TUC-G-16	0	0	1	0	0	1	1	1	0
REINA 52	0	0	0	0	0	0	1	1	5
FORREST	1	0	0	1	0	1	1	1	0
PLAYER. 53	1	0	1	0	0	0	1	1	0
BATARA 54	1	0	1	0	0	0	1	1	0
TJS 2043	1	1	1	0	0	0	0	1	1
A-5780	1	0	0	0	1	0	1	1	1
OFPEC RJFE	0	0	0	1	1	1	1	1	1
ACA 731	1	0	0	0	1	1	1	1	1
A-7372	0	1	0	0	1	1	1	1	1
A-3205	1	0	1	0	0	0	5	5	0
D.MARIO 55	0	0	0	0	0	1	1	1	0
9442	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CARM. INTA	1	5	1	0	1	1	1	0	1
GRAN. 73	1	0	0	0	1	0	1	1	1
COBR. FCA	0	0	0	0	0	1	1	1	0
OFPECNORT	0	0	0	1	0	0	1	1	0
OFPECCORD	5	0	0	0	1	1	1	1	1
9501	0	0	0	0	0	0	5	0	0
ORO FCA	0	5	0	1	0	1	1	1	0
CAMIN. 52	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F. CAS. INTA	0	0	0	0	1	0	1	1	1
RAMSON	0	0	0	0	0	0	1	1	0
H. FA INTA	1	0	5	0	1	1	1	0	1
CARCA.INTA	0	0	0	0	1	1	1	1	1
CO. FA INTA	0	5	1	0	1	0	0	1	0
CE FA INTA	0	0	0	0	0	0	1	1	0
TANC. INTA	1	0	0	0	0	1	0	1	0
COPET. 53	0	0	0	0	0	0	5	1	0
FA-701 INTA	1	5	0	1	1	1	1	1	1
SEMIT 500	1	0	1	0	0	0	1	1	0
A-7306	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TIJER. 42	0	0	0	0	1	0	0	0	1
TJS 2065	0	0	0	0	0	1	1	1	0
RO-FA INTA	0	5	0	0	0	1	1	1	0
NS-555	0	5	0	0	0	0	1	1	0
COLOR. 37	1	5	1	0	0	0	1	0	0
CALAND. 55	0	5	0	1	0	0	1	1	0
FT-11 ALVOR	0	5	0	0	0	0	5	1	0
D. MARIO 48	0	5	0	0	1	0	5	0	1
ACA 571	5	5	0	0	5	5	5	1	0
D. EDU 375	0	0	1	0	1	0	0	0	1
ACA 681	1	0	0	1	1	1	5	1	1
OFPEC R.627	1	0	1	0	1	0	0	0	0
TRESUR 321	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PRIMAV. 100	5	0	0	1	1	0	0	1	1

MAXI. 601	0	0	1	1	1	0	1	1	1
TRESUR 455	1	0	1	0	1	0	0	0	1
OFPEC ENTR	1	0	5	1	1	0	1	1	1
PROMAX 530	0	0	0	1	1	0	1	1	0
D. EDU 510	0	0	0	0	1	1	1	1	1
WILLIAMS	0	0	5	0	1	1	0	0	0
"Primers"	OPY-05	OPY-05	OPY-06	OPY-08	OPY-09	OPY-13	OPY-18	OPA-02	OPA-04
PICs	0,5	0,4	0,3	0,47	0,5	0,33	0,45	0,43	0,47
Banda en pb	750	1200	550	850	900	550	950	750	650
Variedades									
A-7986	0	0	0	0	0	0	1	1	0
RA 702	0	0	0	0	1	0	1	1	0
A 5409	1	0	0	1	0	1	1	1	1
A 6404	1	0	0	0	1	1	1	0	0
NS-641	1	1	1	0	0	1	1	1	1
A-5401	1	0	0	1	1	1	1	0	0
D. MARIO 49	0	1	0	1	1	1	1	1	0
HOOD 75	0	0	0	0	1	1	0	0	1
RA 587	0	1	0	1	1	1	1	1	1
TORCAZA 63	1	0	0	0	0	1	1	1	1
A 6381	1	0	0	0	1	1	1	0	1
A 4702	1	1	0	0	0	1	1	0	1
OFPEC VEN.	1	1	0	0	1	1	1	0	1
NS-642	1	0	0	0	1	1	1	0	0
TORCA. 58	1	0	0	0	0	1	1	0	0
A-4656	1	1	1	0	1	1	0	0	5
A-5308	1	0	0	1	5	1	0	0	1
AVUT. 64	1	0	0	0	1	0	1	1	0
D. MARIO 43	0	0	0	0	1	1	1	0	0
FED. 1 INTA	0	0	0	0	0	1	0	0	1
CHARATA 76	0	0	0	0	1	1	1	1	1
FA-841 INTA	1	0	0	0	0	1	1	1	0
A-4422	0	0	0	1	0	1	0	5	5
PROMAX 550	1	1	1	0	0	1	1	0	1
GOLOND. 65	1	1	0	0	1	1	1	1	1
BRAGG	0	0	0	0	1	1	1	1	0
TJ 2000	1	0	0	0	1	1	0	0	1
TACUA INTA	1	0	5	1	0	1	1	0	1
DEK CX 458	0	1	0	0	1	1	0	0	1
COKER 237	0	0	1	0	1	1	1	1	1
FA-940 INTA	1	0	0	0	1	1	1	1	0
DEK CX 690	1	0	1	0	5	1	1	1	5
A-6443	0	0	1	0	0	1	1	0	0
D. MARIO 57	1	0	0	0	0	1	1	0	1
A-3910	1	1	1	1	1	1	1	0	1
D. MARIO 50	0	1	0	0	1	1	1	0	0
MENE. INTA	1	0	0	0	5	1	1	1	1
M. NAIR 800	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OFPEC SANT	1	0	0	1	0	1	0	0	1
MARTIN. 50	1	1	1	0	1	1	1	0	1
MONTER. 74	1	0	0	0	1	1	1	0	1
FA-837 INTA	0	0	1	0	1	0	5	0	0
TJS 2020	1	0	0	0	1	0	0	0	5

D. FLOR 58	0	0	0	0	1	1	1	0	0
DORADA 48	0	1	1	1	1	1	0	0	1
A-7894	0	0	0	0	1	0	1	1	1
DEK CX 740	1	0	0	0	0	1	1	0	0
OFPEC PUNT	0	0	0	0	0	1	1	0	0
TUC-G-16	1	0	0	0	1	1	1	0	0
REINA 52	1	0	0	0	1	1	1	0	0
FORREST	1	0	0	0	5	0	1	1	0
PLAYER. 53	1	1	0	1	0	1	0	0	0
BATARA 54	1	0	1	1	5	1	1	1	1
TJS 2043	1	1	0	0	0	1	0	0	1
A-5780	1	1	0	0	1	1	1	1	0
OFPEC RJFE	0	0	0	0	1	1	1	0	1
ACA 731	0	0	0	0	0	1	1	1	0
A-7372	0	0	0	0	0	0	1	1	0
A-3205	0	0	0	1	1	1	0	1	0
D.MARIO 55	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9442	0	1	0	1	1	0	0	0	1
CARM. INTA	0	1	0	0	0	0	0	0	1
GRAN. 73	0	0	0	0	1	1	1	0	0
COBR. FCA	0	0	1	1	0	1	0	0	0
OFPECNORT	0	0	1	0	5	1	1	0	0
OFPECCORD	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9501	1	1	1	1	0	1	1	0	0
ORO FCA	0	0	0	1	0	1	0	0	0
CAMIN. 52	0	1	0	1	0	0	0	0	1
F. CAS. INTA	0	0	0	1	1	0	0	0	1
RAMSON	1	0	0	0	0	1	1	0	1
H. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1
CARCA.INTA	0	0	0	1	1	1	1	0	1
CO. FA INTA	1	0	0	1	1	1	1	0	1
CE FA INTA	0	0	0	1	1	1	1	1	0
TANC. INTA	1	0	0	1	0	1	1	0	0
COPET. 53	1	0	0	0	0	1	1	0	0
FA-701 INTA	0	0	0	1	5	1	1	1	1
SEMIT 500	1	0	0	1	0	1	1	0	1
A-7306	0	0	0	0	1	0	0	5	1
TIJER. 42	0	1	0	1	0	0	0	0	1
TJS 2065	1	0	0	0	5	0	0	0	1
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	1	1	0	1
NS-555	1	0	0	0	5	1	1	5	1
COLOR. 37	1	0	1	1	0	0	0	0	1
CALAND. 55	1	0	0	1	5	0	0	0	1
FT-11 ALVOR	1	0	5	0	5	1	1	1	0
D. MARIO 48	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ACA 571	1	1	0	1	0	5	0	5	1
D. EDU 375	1	1	0	1	0	0	0	0	1
ACA 681	1	0	0	0	0	1	1	1	1
OFPEC R.627	1	1	5	1	1	1	0	5	1
TRESUR 321	0	0	0	0	0	1	1	1	0
PRIMAV. 100	0	1	0	1	5	1	0	0	1
MAXI. 601	0	0	5	0	0	1	1	0	1
TRESUR 455	0	0	0	1	1	1	1	0	1
OFPEC ENTR	1	1	0	1	1	0	0	0	1

PROMAX 530	1	1	0	1	5	1	0	5	1
D. EDU 510	0	0	0	0	1	1	1	1	1
WILLIAMS	1	1	1	1	1	1	1	0	1
"Primers"	OPA-04	OPA-04	OPA-05	OPA-18	OPA-19	OPA-19	OPC-05	OPC-05	OPC-05
PICs	0,6	0,5	0,3	0,2	0,5	0,4	0,2	0,32	0,24
Banda en pb	850	950	600	1050	650	600	650	450	300
Variedades									
A-7986	0	1	0	0	5	0	0	1	0
RA 702	0	1	0	1	0	0	0	1	0
A 5409	0	0	0	0	1	0	0	1	1
A 6404	0	0	0	0	1	0	0	1	0
NS-641	0	0	0	0	1	0	0	1	1
A-5401	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D. MARIO 49	1	0	0	0	0	1	1	0	0
HOOD 75	0	1	0	0	5	5	0	1	0
RA 587	0	1	0	5	1	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	1	0	0	1	0
A 6381	0	1	1	0	5	5	0	1	0
A 4702	1	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	0	0	0	1	0
NS-642	1	0	0	0	5	5	0	1	0
TORCA. 58	1	1	0	0	1	0	0	1	0
A-4656	5	5	0	0	5	5	0	1	0
A-5308	0	0	0	0	1	0	0	1	1
AVUT. 64	0	0	0	1	5	5	0	1	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	1	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	0	0	5	5	5	0	1	0
CHARATA 76	0	1	0	0	0	0	0	1	0
FA-841 INTA	0	0	0	1	0	1	0	1	0
A-4422	5	5	0	0	1	0	0	1	0
PROMAX 550	0	0	1	5	5	5	0	1	1
GOLOND. 65	0	1	0	0	0	1	1	1	0
BRAGG	0	1	0	5	0	0	0	1	0
TJ 2000	0	1	1	0	0	0	0	1	0
TACUA INTA	0	1	0	1	1	0	0	1	0
DEK CX 458	1	0	0	0	0	1	0	1	0
COKER 237	0	1	5	0	0	0	0	1	0
FA-940 INTA	0	1	0	0	1	0	0	1	0
DEK CX 690	5	5	0	0	0	1	0	1	0
A-6443	0	5	0	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 57	1	0	0	0	0	1	0	1	0
A-3910	0	0	0	5	0	0	0	1	1
D. MARIO 50	0	0	0	0	1	0	0	1	0
MENE. INTA	0	0	0	1	0	1	0	1	0
M. NAIR 800	0	1	0	0	1	0	1	1	0
OFPEC SANT	0	0	0	0	1	0	0	1	1
MARTIN. 50	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MONTER. 74	0	0	0	0	0	0	0	1	0
FA-837 INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0
TJS 2020	5	5	1	0	1	0	0	1	0
D. FLOR 58	1	1	0	0	5	5	0	1	0
DORADA 48	0	1	0	0	1	0	0	0	1
A-7894	0	1	0	0	0	0	0	1	0

DEK CX 740	0	1	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC PUNT	1	1	0	0	1	0	0	1	0
TUC-G-16	0	1	0	0	0	0	1	1	0
REINA 52	0	1	1	5	0	1	0	0	1
FORREST	1	0	5	0	1	0	0	1	0
PLAYER. 53	0	1	0	0	1	0	0	0	1
BATARA 54	0	0	0	0	1	0	0	1	0
TJS 2043	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A-5780	0	1	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC RJFE	1	1	0	0	5	5	0	1	0
ACA 731	0	1	0	0	0	1	0	1	0
A-7372	0	1	0	0	1	0	0	1	0
A-3205	0	1	0	0	5	5	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	1	0	1	0
9442	1	0	0	0	1	0	0	1	0
CARM. INTA	0	0	0	0	1	0	0	0	0
GRAN. 73	1	1	0	0	1	0	0	1	0
COBR. FCA	1	1	0	0	0	0	1	1	0
OFPECNORT	0	1	1	1	0	1	1	1	0
OFPECCORD	0	0	1	0	1	0	0	1	0
9501	1	0	0	1	0	1	0	0	1
ORO FCA	1	1	0	0	0	1	0	1	0
CAMIN. 52	1	1	0	0	0	1	0	0	1
F. CAS. INTA	0	1	0	0	5	1	0	1	0
RAMSON	1	1	0	0	0	0	0	1	0
H. FA INTA	0	1	1	0	1	0	0	0	0
CARCA.INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0
CO. FA INTA	0	0	1	0	0	1	0	1	0
CE FA INTA	1	0	0	0	1	0	1	1	0
TANC. INTA	0	0	1	0	0	1	0	1	0
COPET. 53	0	0	0	0	0	1	0	1	0
FA-701 INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0
SEMIT 500	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A-7306	0	0	1	1	0	1	1	1	0
TIJER. 42	0	0	0	0	0	1	0	0	1
TJS 2065	0	0	1	0	0	1	0	1	0
RO-FA INTA	1	1	0	0	0	1	0	1	0
NS-555	1	0	1	0	1	0	0	1	0
COLOR. 37	0	0	0	0	1	0	0	1	0
CALAND. 55	0	0	0	5	1	0	0	1	0
FT-11 ALVOR	1	1	0	1	1	0	0	1	0
D. MARIO 48	1	0	0	0	1	0	0	0	0
ACA 571	0	0	0	0	0	1	0	1	0
D. EDU 375	1	0	0	0	1	0	1	1	1
ACA 681	0	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC R.627	0	0	0	0	1	0	0	1	1
TRESUR 321	1	0	1	5	1	0	0	1	0
PRIMAV. 100	0	0	0	1	1	0	0	1	0
MAXI. 601	0	1	1	0	1	0	0	1	0
TRESUR 455	0	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC ENTR	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PROMAX 530	0	0	1	0	5	5	0	1	0
D. EDU 510	0	0	1	0	1	0	0	0	0
WILLIAMS	1	0	1	0	5	5	0	0	0

"Primers"	OPC-07	OPC-07	OPC-08	OPC-08
PICs	0,4	0,13	0,48	0,27
Banda en pb	750	650	1000	850
Variedades				
A-7986	0	1	1	0
RA 702	1	1	1	0
A 5409	1	1	0	0
A 6404	0	1	5	5
NS-641	1	1	1	0
A-5401	0	1	0	0
D. MARIO 49	0	0	1	0
HOOD 75	0	1	1	0
RA 587	1	0	0	0
TORCAZA 63	0	1	0	0
A 6381	1	1	1	0
A 4702	0	1	5	5
OFPEC VEN.	0	1	0	0
NS-642	1	1	5	5
TORCA. 58	1	1	5	5
A-4656	1	1	1	0
A-5308	1	1	1	0
AVUT. 64	1	1	1	0
D. MARIO 43	1	1	1	0
FED. 1 INTA	0	1	0	0
CHARATA 76	1	1	1	0
FA-841 INTA	1	1	0	1
A-4422	1	1	1	0
PROMAX 550	1	1	1	0
GOLOND. 65	1	1	1	0
BRAGG	5	1	0	0
TJ 2000	1	1	1	0
TACUA INTA	1	1	1	1
DEK CX 458	1	1	5	1
COKER 237	0	1	1	0
FA-940 INTA	1	1	0	1
DEK CX 690	0	1	1	0
A-6443	1	1	1	0
D. MARIO 57	1	1	0	1
A-3910	1	1	1	0
D. MARIO 50	1	0	0	0
MENE. INTA	1	1	0	5
M. NAIR 800	0	1	1	0
OFPEC SANT	1	1	1	0
MARTIN. 50	1	1	0	0
MONTER. 74	1	1	1	0
FA-637 INTA	0	1	1	1
TJS 2020	0	1	1	0
D. FLOR 58	0	1	1	0
DORADA 48	1	0	5	5
A-7894	1	1	1	0
DEK CX 740	1	1	1	0
OFPEC PUNT	1	1	1	0
TUC-G-16	0	1	1	0

REINA 52	1	1	1	0
FORREST	1	1	1	0
PLAYER. 53	1	1	0	0
BATARA 54	1	1	5	5
TJS 2043	0	1	1	0
A-5780	1	1	1	0
OFPEC RJFE	0	1	0	1
ACA 731	1	1	1	0
A-7372	0	1	1	0
A-3205	0	1	1	0
D.MARIO 55	5	5	5	5
9442	1	1	0	0
CARM. INTA	1	1	5	1
GRAN. 73	1	1	1	0
COBR. FCA	1	1	0	0
OFPECNORT	1	1	0	0
OFPECCORD	1	1	0	1
9501	1	0	0	0
ORO FCA	0	1	0	1
CAMIN. 52	1	1	0	0
F. CAS. INTA	5	5	5	5
RAMSON	1	1	1	0
H. FA INTA	0	1	0	0
CARCA.INTA	1	1	0	0
CO. FA INTA	1	1	0	1
CE FA INTA	1	1	1	0
TANC. INTA	0	1	0	1
COPET. 53	1	1	5	0
FA-701 INTA	1	1	0	1
SEMIT 500	1	1	5	5
A-7306	1	1	0	0
TIJER. 42	1	1	1	1
TJS 2065	1	1	0	0
RO-FA INTA	1	1	1	0
NS-555	1	1	1	0
COLOR. 37	0	1	0	0
CALAND. 55	0	1	1	0
FT-11 ALVOR	1	1	1	0
D. MARIO 48	1	1	0	0
ACA 571	1	0	5	0
D. EDU 375	1	1	0	0
ACA 681	1	1	0	0
OFPEC R.627	5	0	1	0
TRESUR 321	1	1	1	0
PRIMAV. 100	0	1	0	0
MAXI. 601	0	1	1	0
TRESUR 455	1	1	0	0
OFPEC ENTR	0	1	1	1
PROMAX 530	1	1	1	0
D. EDU 510	1	1	1	0
WILLIAMS	1	1	0	0

2.2 Obtención del “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de AFLP.

Se realizó la evaluación y caracterización de la variabilidad genética existente entre variedades de soja y obtener así una “huella digital genotípica” para cada variedad con marcadores AFLP.

La técnica de AFLP no requiere de una selección inicial, como en el caso de los RAPD, a fin de escoger las combinaciones de “primers” que permitan visualizar polimorfismos. Esto se debe a la gran cantidad de fragmentos que se generan por cada amplificación. Las 5 combinaciones de “primers” *EcoRI/MseI* con tres y cuatro nucleótidos selectivos (+3) y (+4), produjeron un total de 189 bandas de las cuales 32 evidenciaron polimorfismos de marcadores AFLP (6.4 marcadores polimórficos/combinación).

Se utilizaron las siguientes 5 combinaciones de primers *EcoRI* (E) y *MseI* (M): E126/M142, E125/M141, E40/M43, E40/M45, E36/M43. Todas las combinaciones produjeron marcadores polimórficos (entre 4 y 10).

Al ser los AFLP marcadores de visualización dominante, se cuantificó el tamaño de los fragmentos polimórficos, en pares de bases, comparando con un marcador de peso molecular y se computó la presencia o ausencia de la banda para cada variedad.

La **Tabla V**, indica las combinaciones de “primers” utilizadas con el respectivo resultado.

Tabla V: Resultados de las 5 combinaciones de “primers” ensayados. Se especifica el número de marcadores polimórficos y el número total de bandas observadas por combinación de “primers”.

Código de combinación de “primers”	Secuencia de nucleótidos selectivos 5´ a 3´	Número de marcadores polimórficos	Número de bandas totales
E126/M142	E-ACTT / M-AGTT	6	40
E125/M141	E-ACTG / M-AGTG	4	47
E40/M43	E-AGC / M-ATA	6	32
E40/M45	E-AGC / M-ATG	6	38
E36/M43	E-ACC / M-ATA	10	32
TOTAL	5 combinaciones	32	189

De lo observado en la **Tabla V**, el grado de polimorfismo encontrado por combinación de “primers” (en comparación con otras especies) resultó ser relativamente bajo, salvo para la combinación E36/M43, la cual presentó 10 polimorfismos, sobre un total de 32 bandas visibles.

La obtención de “huellas digitales genotípicas”, por la técnica de AFLP, produjo los siguientes resultados: con las 5 combinaciones de “primers” utilizadas, se analizaron 189 *loci* potenciales de los cuales evidenciaron 32 polimorfismos, las cuales fueron utilizadas como diagnóstico para obtener una identificación o “huella digital genotípica” de las 100 variedades de soja con propiedad en la Argentina.

En la **Figura 7**, se muestra a modo de ejemplo, los patrones de 27 variedades, para la combinación de “primers” E36/M43, que fue la que reveló mayor grado de polimorfismo.

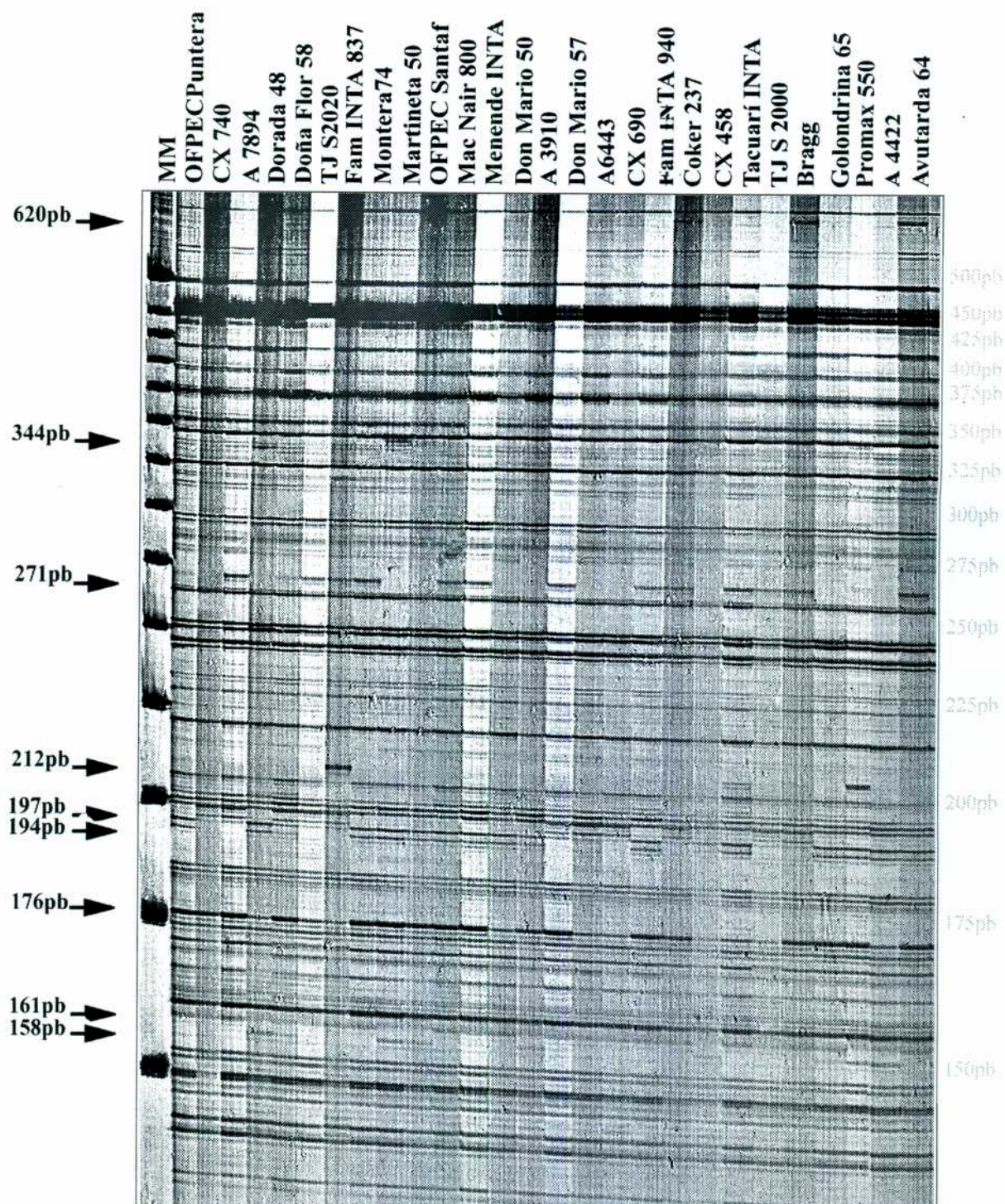


Fig. 7 Representación de un patrón AFLP utilizando la combinación de “primers” E36/M43, en 27 variedades de soja. Se observan 9 de las 10 bandas polimórficas (marcadores) encontradas. Las flechas indican los marcadores y sus respectivas longitudes en pares de base (pb). A la derecha de la figura, se indican los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular, 50 pb de PROMEGA. Productos de PCR corridos en geles de secuencia (6% TBE1x) revelados con nitrato de plata.

Se estudió la variabilidad genética existente entre todas las variedades de soja analizadas, con las 5 combinaciones de “primers” y se cuantificó el tamaño de las bandas polimórficas, en pares de bases.

El resultado de este trabajo se observa en la **Tabla VI**, donde se determina el “documento de identidad genético” para cada variedad, por marcadores AFLP.

Tabla VI: “Documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, por la técnica de AFLP. Se especifica la combinación de “primers” utilizada, su respectivo índice de contenido polimórfico (PIC) y el tamaño de las bandas en pares de bases(pb). Los códigos: (1) significa presencia / (0) ausencia / (5) no encontrado.

Combinación de "primers"	E- ACTT / M- AGTT						E- ACTG / M- AGTG			
Marcador (pb)	84	100	165	219	221	392	130	168	720	725
PICs	0,48	0,04	0,04	0,20	0,46	0,04	0,06	0,07	0,27	0,30
Variedades										
A-7986	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
RA 702	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A 5409	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A 6404	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
NS-641	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
A-5401	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
D. MARIO 49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
HOOD 75	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
RA 587	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
TORCAZA 63	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
A 6381	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
A 4702	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
OFPEC VEN.	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
NS-642	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
TORCACI 58	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-4656	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-5308	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AVUT. 64	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
FED. 1 INTA	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1
CHARATA 76	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
FA-841 INTA	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-4422	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
PROMAX 550	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
GOLOND. 65	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
BRAGG	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
TJ S 2000	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
TACUA INTA	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
DEK CX 458	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
COKER 237	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
FA-940 INTA	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
DEK CX 690	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
A-6443	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
D. MARIO 57	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-3910	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
MENE. INTA	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
M. NAIR 800	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
OFPEC SANT	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MARTIN. 50	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
MONTER. 74	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
FA-837 INTA	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
TJS 2020	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1

D. FLOR 58	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
DORADA 48	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
A-7894	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
DEK CX 740	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
OFPEC PUNT	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
TUC-G-16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
REINA 52	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
FORREST	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
PLAYER. 53	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
BATARA 54	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
TJ S 2043	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A-5780	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
OFPEC RJFE	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
ACA 731	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-7372	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
A-3205	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
9442	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CARM. INTA	0	0	0	5	1	0	0	0	1	1
GRAN. 73	0	0	0	5	1	0	0	0	1	1
COBR. FCA	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
OFPEC NORT	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
OFPEC CORD	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
9501	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
ORO FCA	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
F. CAS. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
RAMSON	0	0	0	5	0	0	1	0	1	0
H. FA INTA	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
CARCA. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
CO. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
CE FA INTA	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TANC. INTA	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
COPET. 53	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
FA-701 INTA	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
SEMIT 500	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
A-7306	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
TIJER. 42	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TJS 2065	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RO-FA INTA	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
NS-555	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
COLOR. 37	0	0	0	5	1	0	1	1	0	0
CALAND. 55	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
FT-11 ALVOR	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
D. MARIO 48	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
ACA 571	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
D. EDU 375	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0
ACA 681	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
OFPEC R.627	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
TRESUR 321	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
PRIMAV. 100	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
MAXI. 601	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
TRESUR 455	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC ENTR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1

PROMAX 530	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
D. EDU 510	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
WILLIAMS	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Combinación de "primers"	E- AGC / M- ATA									
Marcador (pb)	131	200	325	336	358	370				
PICs	0,15	0,44	0,14	0,45	0,26	0,01				
Variedades										
A-7986	0	1	0	0	0	0				
RA 702	0	1	0	0	0	0				
A 5409	0	1	1	0	0	0				
A 6404	0	0	0	1	0	5				
NS-641	0	1	0	1	0	1				
A-5401	0	0	0	1	0	0				
D. MARIO 49	0	1	0	0	0	0				
HOOD 75	0	0	0	1	1	0				
RA 587	0	0	0	0	0	0				
TORCAZA 63	0	0	0	0	0	0				
A 6381	0	1	0	1	0	0				
A 4702	0	1	0	1	0	0				
OFPEC VEN.	0	0	0	1	1	0				
NS-642	0	1	0	0	0	0				
TORCACI 58	0	1	0	1	0	0				
A-4656	0	1	0	1	0	0				
A-5308	0	1	0	1	0	0				
AVUT. 64	0	1	0	1	0	0				
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	0				
FED. 1 INTA	0	0	0	1	1	0				
CHARATA 76	0	1	0	0	0	0				
FA-841 INTA	1	1	0	1	0	0				
A-4422	0	0	0	0	0	0				
PROMAX 550	0	1	0	0	0	0				
GOLOND. 65	0	1	0	1	0	0				
BRAGG	0	1	0	1	0	0				
TJ S 2000	0	1	0	1	0	0				
TACUA INTA	0	0	0	0	0	0				
DEK CX 458	0	0	0	0	0	0				
COKER 237	0	1	0	0	1	0				
FA-940 INTA	1	1	0	0	0	1				
DEK CX 690	0	0	0	1	0	0				
A-6443	0	0	0	0	0	0				
D. MARIO 57	0	0	0	1	0	0				
A-3910	0	1	0	5	0	0				
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	0				
MENE. INTA	1	1	0	1	0	1				
M. NAIR 800	0	0	1	1	0	0				
OFPEC SANT	0	1	0	0	0	0				
MARTIN. 50	0	1	1	1	0	0				
MONTER. 74	0	1	0	1	0	0				
FA-837 INTA	1	1	0	1	0	0				
TJS 2020	0	1	0	0	0	0				
D. FLOR 58	0	0	0	1	0	0				
DORADA 48	0	1	0	0	0	0				
A-7894	0	1	0	1	0	0				

DEK CX 740	0	1	0	0	0	0
OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	0
TUC-G-16	1	1	0	1	0	0
REINA 52	0	0	0	1	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	0
PLAYER. 53	0	1	0	1	0	0
BATARA 54	0	1	0	1	0	0
TJ S 2043	0	1	0	1	1	0
A-5780	0	1	0	1	0	0
OFPEC RJFE	5	5	0	5	0	0
ACA 731	0	1	0	0	1	0
A-7372	1	1	0	0	0	0
A-3205	0	1	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	1	0	1	0	0
9442	0	1	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	0	1	1	0
GRAN. 73	0	1	0	1	0	0
COBR. FCA	0	0	0	0	0	1
OFPEC NORT	1	1	0	1	0	0
OFPEC CORD	0	0	0	0	1	0
9501	0	1	0	1	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	0	0
CAMIN. 32	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	0	5	0	5	5	0
RAMSON	0	1	0	1	0	0
H. FA INTA	0	0	0	1	1	0
CARCA. INTA	0	1	0	0	1	0
CO. FA INTA	0	0	0	0	0	0
CE FA INTA	0	1	1	1	0	0
TANC. INTA	0	1	0	0	0	0
COPE. 53	0	1	1	1	0	0
FA-701 INTA	0	1	0	1	0	0
SEMIT 500	0	0	0	1	0	0
A-7306	0	1	0	0	0	0
TIJER. 42	0	1	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	0	0	0	0	0
NS-555	0	1	0	1	0	0
COLOR. 37	0	1	0	1	0	0
CALAND. 55	0	1	0	1	0	0
FT-11 ALVOR	1	1	0	1	0	1
D. MARIO 48	0	1	0	1	0	0
ACA 571	0	0	0	0	1	0
D. EDU 375	0	1	0	1	0	0
ACA 681	0	1	0	1	1	0
OFPEC R.627	0	1	0	1	0	0
TRESUR 321	0	1	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	1	0	1	0	0
MAXI. 601	0	0	0	0	1	0
TRESUR 455	0	1	0	0	0	0
OFPEC ENTR	0	1	0	0	1	0
PROMAX 530	0	0	0	1	0	0
D. EDU 510	0	1	0	1	0	0
WILLIAMS	0	1	0	1	0	0

Combinación de "primers"	E- AGC / M- ATG					
Marcador (pb)	136	192	195	240	292	479
PICs	0,35	0,30	0,06	0,5	0,13	0,46
Variedades						
A-7986	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	0	0	0	1
A 5409	0	0	0	1	0	0
A 6404	0	0	0	1	0	0
NS-641	0	0	0	0	0	0
A-5401	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 49	0	1	0	0	0	0
HOOD 75	0	0	0	1	0	1
RA 587	0	0	0	1	0	1
TORCAZA 63	0	0	0	1	0	0
A 6381	0	0	0	1	0	0
A 4702	1	1	0	0	1	0
OFPEC VEN.	0	1	0	1	0	1
NS-642	1	0	0	0	0	0
TORCACI 58	0	0	0	1	0	0
A-4656	1	1	0	0	1	0
A-5308	0	0	0	1	0	0
AVUT. 64	0	0	0	0	0	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	0	0	1	0	1
CHARATA 76	0	0	0	1	0	1
FA-841 INTA	0	0	0	0	1	1
A-4422	0	0	0	0	0	0
PROMAX 550	0	0	0	1	0	0
GOLOND. 65	0	1	0	0	0	0
BRAGG	0	0	0	0	0	0
TJ S 2000	0	0	0	0	0	1
TACUA INTA	1	1	0	1	0	1
DEK CX 458	1	0	0	0	0	0
COKER 237	0	0	0	0	0	1
FA-940 INTA	0	0	0	0	0	0
DEK CX 690	0	0	0	1	0	1
A-6443	0	0	0	1	0	1
D. MARIO 57	0	0	0	1	0	1
A-3910	1	0	0	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	1	0
MENE. INTA	0	0	0	0	0	0
M. NAIR 800	0	5	0	0	5	0
OFPEC SANT	0	0	0	1	0	0
MARTIN. 50	0	0	0	1	0	0
MONTER. 74	0	0	0	0	0	1
FA-837 INTA	0	0	0	1	0	0
TJS 2020	0	0	0	0	0	1
D. FLOR 58	0	0	0	1	0	1
DORADA 48	1	0	0	0	1	0
A-7894	0	0	0	1	0	0
DEK CX 740	0	0	0	0	0	1
OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	1
TUC-G-16	0	0	0	1	0	1

REINA 52	0	0	0	1	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	1
PLAYER. 53	0	0	0	1	0	0
BATARA 54	0	0	0	1	0	0
TJ S 2043	0	1	0	0	0	0
A-5780	0	0	0	0	0	0
OFPEC RJFE	0	0	0	1	0	1
ACA 731	0	0	0	0	0	1
A-7372	0	0	0	0	0	0
A-3205	1	1	0	0	0	0
D.MARIO 55	0	0	0	0	0	1
9442	1	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	0	0	0	0
GRAN. 73	0	0	0	0	0	0
COBR. FCA	0	0	0	1	0	0
OFPEC NORT	0	0	0	1	0	0
OFPEC CORD	1	0	0	1	0	1
9501	0	1	0	0	0	0
ORO FCA	0	1	0	1	0	0
CAMIN. 32	1	0	0	1	0	0
F. CAS. INTA	0	0	0	1	0	1
RAMSON	5	5	0	5	0	5
H. FA INTA	0	0	0	0	0	1
CARCA. INTA	0	1	0	1	0	1
CO. FA INTA	0	0	0	1	0	1
CE FA INTA	1	1	0	1	0	1
TANC. INTA	0	0	0	1	0	0
COPET. 53	0	0	0	1	0	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	1
SEMIT 500	0	0	0	1	0	0
A-7306	5	5	0	0	0	0
TIJER. 42	0	0	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	0	1	0	1
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	0
NS-555	0	0	0	0	0	0
COLOR. 37	1	1	0	0	0	0
CALAND. 55	0	0	0	1	1	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 48	1	0	0	0	0	0
ACA 571	0	1	0	1	0	0
D. EDU 375	1	0	0	0	0	0
ACA 681	5	0	0	0	0	1
OFPEC R.627	0	0	0	0	0	1
TRESUR 321	0	0	0	0	0	0
PRIMAV. 100	1	0	0	0	0	1
MAXI. 601	0	0	0	1	0	1
TRESUR 455	1	0	0	0	0	0
OFPEC ENTR	0	0	0	1	0	1
PROMAX 530	1	1	0	1	0	0
D. EDU 510	0	0	1	1	0	1
WILLIAMS	1	0	1	0	0	0

Combinación de "primers"	E- ACC / M- ATA									
Marcador (pb)	116	158	161	176	194	197	212	271	344	620
PICs	0,02	0,45	0,07	0,5	0,47	0,47	0,16	0,5	0,14	0,22
Variedades										
A-7986	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
RA 702	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
A 5409	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
A 6404	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
NS-641	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A-5401	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
D. MARIO 49	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
HOOD 75	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
RA 587	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
A 6381	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
A 4702	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
OFPEC VEN.	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
NS-642	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
TORCACI 58	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
A-4656	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A-5308	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
AVUT. 64	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
D. MARIO 43	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
FED. 1 INTA	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
CHARATA 76	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
FA-841 INTA	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
A-4422	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
PROMAX 550	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
GOLOND. 65	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
BRAGG	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
TJ S 2000	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
TACUA INTA	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
DEK CX 458	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
COKER 237	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
FA-940 INTA	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
DEK CX 690	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A-6443	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 57	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
A-3910	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
MENE. INTA	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
M. NAIR 800	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
MARTIN. 50	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
MONTER. 74	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
TJS 2020	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
D. FLOR 58	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
DORADA 48	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A-7894	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
DEK CX 740	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
OFPEC PUNT	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
TUC-G-16	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0

REINA 52	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
FORREST	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
PLAYER. 53	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
BATARA 54	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
TJ S 2043	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
A-5780	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	5	5	1	1	0	0	1	0	1
ACA 731	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
A-7372	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
A-3205	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
9442	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
CARM. INTA	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
GRAN. 73	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
COBR. FCA	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
OFPEC NORT	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
9501	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
RAMSON	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
H. FA INTA	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CARCA. INTA	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
CO. FA INTA	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
CE FA INTA	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
TANC. INTA	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
COPE. 53	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
FA-701 INTA	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
SEMIT 500	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
A-7306	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
TIJER. 42	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
TJS 2065	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
NS-555	0	0	1	1	5	0	0	0	0	0
COLOR. 37	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
CALAND. 55	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
ACA 571	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
D. EDU 375	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
ACA 681	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
OFPEC R.627	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
TRESUR 321	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
PRIMAV. 100	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
MAXI. 601	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
TRESUR 455	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
OFPEC ENTR	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PROMAX 530	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
D. EDU 510	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
WILLIAMS	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

2.3 Obtención del “documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina, mediante el análisis de SSR.

Los 30 microsatélites estudiados, fueron seleccionados sobre la base de su localización en distintas posiciones del genoma de acuerdo a informaciones obtenidas del mapa genético, desarrollado y recientemente publicado por USDA/Iowa St. Univ. , The Univ. of Utah, y Univ. of Nebraska, EUA (<http://129.186.26.94/SSR.html>, *SoyBase* Home Page, julio de 1998).

El mapa genético consta de 20 grupos de ligamientos en donde los 30 *loci* se ubican en 16 de los mismos.

Como se explicó en materiales y métodos, la técnica de SSR es de visualización co-dominante, por lo tanto se midieron todos los tamaños en pares de bases de cada alelo presente en cada *locus*, comparando con el tamaño del alelo en la muestra de referencia “Williams”, como así también con un marcador de tamaño molecular y un patrón de secuencia nucleotídica, a fin de determinar los tamaños exactos de los mismos.

La **Tabla VII**, muestra los resultados obtenidos:

TablaVII: Número de alelos, rango de tamaño de alelos, índice de contenido polimórfico (PIC) y grupo de ligamiento de 30 microsatélites ensayados en 100 variedades de soja con propiedad en Argentina. El mapa genético utilizado para elegir los marcadores, es el desarrollado por USDA/Iowa State, del estudio de una población F2 de 59 plantas, provenientes del cruzamiento *G. max* x *G. soja*, la Univ. of Utah, en el estudio de una F2 de 240 líneas del cruzamiento *Minsoy* x *Noir* 1 RIL, Univ. of Nebraska, del estudio de una población F2 de 57 plantas por el cruzamiento de *Clark* x *Harosoy* y el correspondiente grupo de ligamiento clásico.

Locus	Rango de tamaño de alelos (pb)	Número de alelos	PICs	Grupo de ligamiento
BARC-SATT001	82-117	4	0.36	K/U24
BARC-SATT002	127-145	4	0.41	D2/U12
BARC-SATT005	141-183	8	0.70	D1b+W/ U19
BARC-SATT009	163-223	5	0.71	N/U06
BARC-SATT030	152-170	6	0.75	F/U13a+ U13b
BARC-SATT038	169-177	3	0.44	G/U05
BARC-SATT042	160-175	5	0.62	A1/U07
BARC-SATT045	134-150	5	0.54	E/U18+ U02
BARC-SATT046	177-240	4	0.30	K/U24
BARC-SATT070	150-176	5	0.56	B2/U26
BARC-SATT100	138-165	4	0.43	C2/U09

BARC-SATT114	82-121	4	0.71	F/U13a+ U13b
BARC-SATT177	108-120	4	0.63	A2/U03
BARC-SATT226	300-331	4	0.65	D2/U12
BARC-SATT294	244-290	4	0.56	C1/U22
BARC-SATT253	135-153	4	0.56	H/U10
BARC-SATT231	216-243	5	0.68	E/U18+ U02
BARC-SATT353	111-126	3	0.58	H/U10
BARC-SATT175	155-179	4	0.62	M/U11
BARC-SATT173	198-257	5	0.62	O/U21
BARC-SATT168	227-236	4	0.56	B2/U26
BARC-SATT534	236-269	7	0.72	B2/U26
BARC-SATT414	260-312	6	0.80	J/U01
BARC-SATT577	115-123	3	0.62	B2/U26
BARC-SATT259	127-154	5	0.66	O/U21
BARC-SATT172	221-236	4	0.50	D1b+W/ U19
BARC-SATT358	350-356	2	0.40	O/U21
BARC-SATT357	215-319	3	0.49	C2/U09
BARC-SATT324	225-241	4	0.67	G/U05
BARC-SATT249	227-257	4	0.46	J/U01

El nombre completo de los *loci* incluye el prefijo **BARC**, por “Beltsville Agricultural Research Center”, EUA, pero usualmente es omitido con fines de abreviación. **SATT**, significa *locus* cuyo “motivo de repetición” es un tri-nucleótido **ATT**.

De lo observado en la **Tabla VII**, el grado de polimorfismo encontrado por *locus* resultó ser relativamente alto. El número de alelos fue entre 2 a 8 y los índices de contenido polimórfico (PICs) entre 0.30 a 0.80, mostrando de esta manera algunos microsatélites ser más informativos que otros para la identificación de variedades.

En la **Figura 8**, se muestra a modo de ejemplo, los patrones de 43 variedades de soja obtenidos del estudio del *locus* BARC-SATT030, donde se observa la presencia de 6 alelos, que fueron los encontrados en las 100 variedades de soja. Como se explicó con anterioridad los tamaños de cada alelo se compararon con un marcador de tamaño molecular.

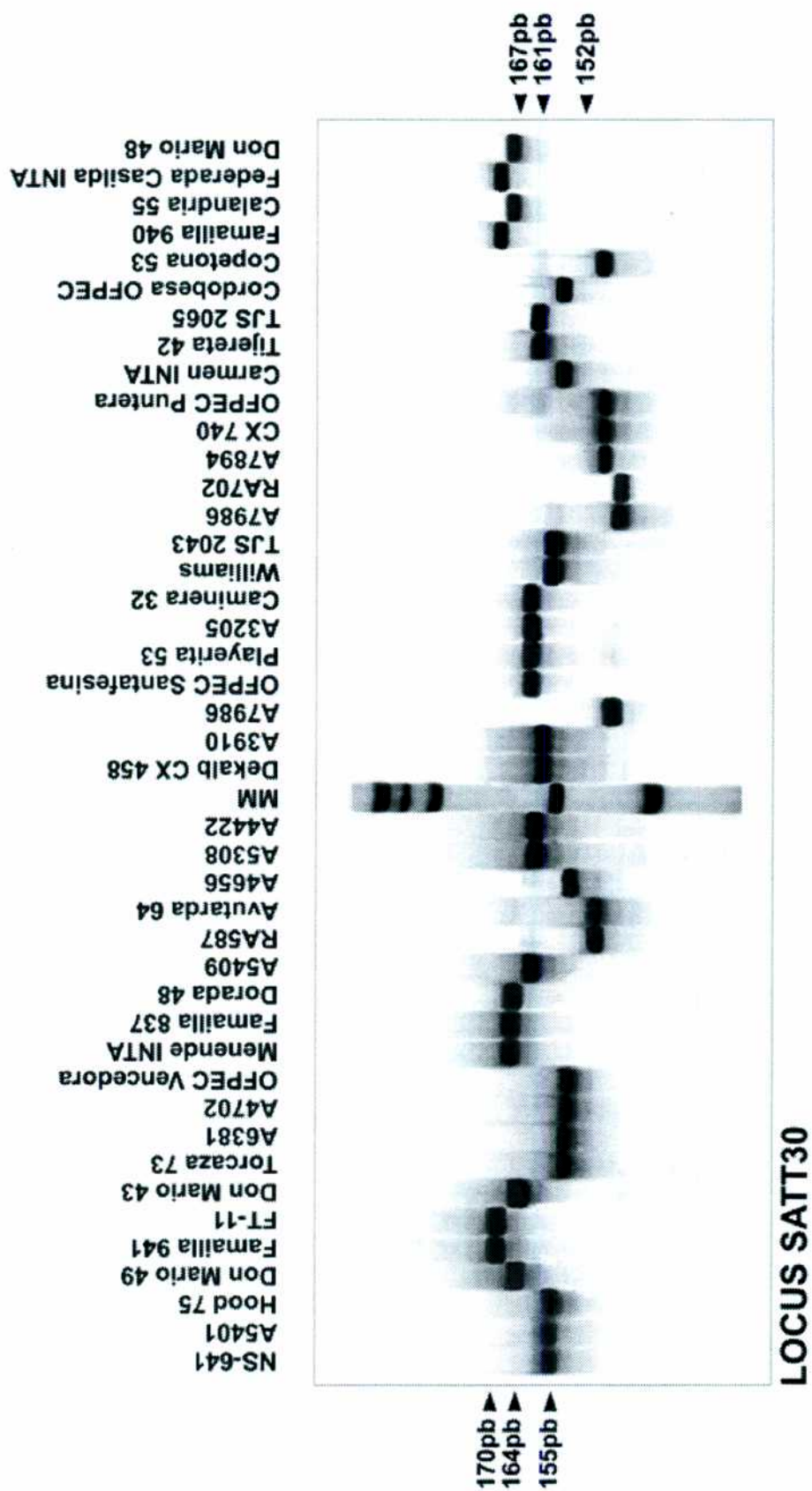


Fig. 8: Se muestra el locus SATT030, en 43 variedades de soja. Se detectaron 6 alelos entre todas las variedades analizadas, cuyos tamaños en pares de bases (pb), se indican por las flechas por comparación con un marcador de tamaño molecular conocido y una secuencia nucleotídica. Productos de PCR, corridos en gel de secuencia (6% TBE), revelado con nitrato de plata.

Luego del análisis de los 30 microsatélites en las 100 variedades de soja con propiedad en la Argentina y la determinación de tamaños de los alelos respectivos para cada *locus* en pares de bases, se determinó el “documento de identidad genético” para cada variedad.

La **Tabla VIII**, muestra el “documento de identidad genético” para cada variedad, por la técnica de microsatélites (SSR).

Tabla VIII: “Documento de identidad genético” de variedades de soja con propiedad en Argentina. Se especifica el nombre de los *loci*, su respectivo índice de contenido polimórfico (PIC) y el tamaño de los alelos en pares de base (pb). El tamaño de los alelos se obtuvo por comparación con un marcador de tamaño molecular conocido y una secuencia nucleotídica, adaptada a revelación con nitrato de plata. Se utilizó un genotipo de referencia “Williams”, que genera bandas cuyos tamaños (en pares de bases), son conocidos (en algunos casos) y otros fueron calculados y chequeados conjuntamente con el Dr. Perry Cregan, USDA, EUA. Los códigos (1) significan presencia del alelo, (0) ausencia del alelo y (5) no encontrado, luego de tres repeticiones.

LOCUS	BARC SATT 030						BARC SATT 114			
Grupo de Ligamiento	F/U13a +U13b						F/13A+ U13b			
PIC	0,75						0,71			
ALELO (pb)	152	155	161	164	167	170	82	97	109	121
Variedades										
A-7986	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RA 702	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A 5409	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A 6404	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NS-641	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
A-5401	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 49	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HOOD 75	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
RA 587	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A 6381	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
A 4702	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC VEN.	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
NS-642	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TORCACI 58	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A-4656	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A-5308	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AVUT. 64	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 43	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-4422	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
PROMAX 550	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
GOLOND. 65	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
BRAGG	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
TJ S 2000	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
TACUA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
DEK CX 458	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
COKER 237	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
FA-940 INTA	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

DEK CX 690	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-6443	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 57	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
A-3910	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MENE. INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
M. NAIR 800	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MARTIN. 50	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
MONTER. 74	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
FA-837 INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TJS 2020	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D. FLOR 58	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
A-7894	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DEK CX 740	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC PUNT	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
TUC-G-16	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
REINA 52	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FORREST	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
PLAYER. 53	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BATARA 54	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
TJ S 2043	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A-5780	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC RJFE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
ACA 731	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-3205	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
9442	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
CARM. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
GRAN. 73	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
COBR. FCA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC NORT	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
9501	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
ORO FCA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
F. CAS. INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RAMSON	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
H. FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CARCA. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CO. FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
CE FA INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TANC. INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
COPET. 53	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
FA-701 INTA	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
SEMIT 500	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-7306	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
TIJER. 42	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
TJS 2065	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RO-FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
NS-555	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
COLOR. 37	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0

CALAND. 55	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ACA 571	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
ACA 681	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
PRIMAV. 100	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MAXI. 601	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC ENTR	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
PROMAX 530	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
D. EDU 510	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
WILLIAMS	0	0	0		0	0	0	0	1	0

LOCUS	BARC SATT 009					BARC SATT 045				
Grupo de Ligamiento	N/U06					E/U18+ U02				
PIC	0,71					0,54				
ALELO (pb)	163	181	214	217	223	134	137	140	143	150
Variedades										
A-7986	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A 5409	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A 6404	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
NS-641	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
A-5401	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 49	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
HOOD 75	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
RA 587	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A 6381	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A 4702	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-642	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
TORCACI 58	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A-4656	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-5308	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AVUT. 64	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A-4422	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
PROMAX 550	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
GOLOND. 65	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
BRAGG	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TJ S 2000	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
TACUA INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
DEK CX 458	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
COKER 237	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
FA-940 INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
DEK CX 690	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A-6443	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 57	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A-3910	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
MENE. INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M. NAIR 800	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
MARTIN. 50	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MONTER. 74	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TJS 2020	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. FLOR 58	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A-7894	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
DEK CX 740	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC PUNT	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

TUC-G-16	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
REINA 52	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FORREST	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
PLAYER. 53	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BATARA 54	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TJ S 2043	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A-5780	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
ACA 731	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A-7372	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A-3205	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
9442	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
GRAN. 73	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
COBR. FCA	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC NORT	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
9501	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ORO FCA	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CAMIN. 32	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RAMSON	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
H. FA INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CARCA. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
CO. FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
CE FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
TANC. INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
COPET. 53	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
SEMIT 500	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-7306	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
TIJER. 42	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-555	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
COLOR. 37	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CALAND. 55	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
D. MARIO 48	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
ACA 571	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
D. EDU 375	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
ACA 681	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
TRESUR 321	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
MAXI. 601	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC ENTR	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PROMAX 530	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
D. EDU 510	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
WILLIAMS	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

LOCUS	BARC SATT 005							
Grupo de Ligamiento	D1b+W /U19							
PIC	0,70							
ALELO (pb)	141	150	156	162	168	171	174	183
Variedades								
A-7986	0	0	0	1	0	0	0	0
RA 702	0	1	0	0	0	0	0	0
A 5409	1	0	0	0	0	0	0	0
A 6404	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-641	1	0	0	0	0	0	1	0
A-5401	1	0	0	0	0	0	0	0
D. MARIO 49	0	0	0	0	0	1	0	0
HOOD 75	0	0	0	1	0	0	0	0
RA 587	0	1	0	0	0	0	0	0
TORCAZA 63	0	0	0	1	0	0	0	0
A 6381	0	0	0	1	0	0	0	0
A 4702	1	0	0	0	0	0	0	0
OFPEC VEN.	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-642	0	1	0	0	0	0	0	0
TORCACI 58	0	0	0	1	0	0	0	0
A-4656	1	0	0	0	0	0	0	0
A-5308	1	0	0	0	0	0	0	0
AVUT. 64	0	1	0	0	0	0	0	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
CHARATA 76	0	1	0	0	0	0	0	0
FA-841 INTA	0	1	0	0	0	0	0	0
A-4422	1	0	0	0	0	0	0	0
PROMAX 550	0	0	0	1	0	0	0	0
GOLOND. 65	0	0	0	0	0	1	0	0
BRAGG	0	1	0	0	0	0	0	0
TJ S 2000	0	0	0	0	1	0	0	0
TACUA INTA	1	0	0	0	0	0	0	0
DEK CX 458	1	0	0	0	0	0	0	0
COKER 237	0	1	0	0	0	0	0	0
FA-940 INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
DEK CX 690	0	0	0	1	0	0	0	0
A-6443	0	1	0	0	0	0	0	1
D. MARIO 57	0	0	0	0	0	0	0	1
A-3910	1	0	0	0	0	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	0	0	1	0	0
MENE. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
M. NAIR 800	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	0	0	0
MARTIN. 50	0	0	0	1	0	0	0	0
MONTER. 74	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-837 INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
TJS 2020	0	0	0	1	0	0	0	0
D. FLOR 58	1	0	0	0	0	0	0	0
DORADA 48	0	0	0	0	0	1	0	0
A-7894	0	0	0	1	0	0	0	0
DEK CX 740	0	1	0	0	0	0	0	0
OFPEC PUNT	0	1	0	0	0	0	0	0

TUC-G-16	0	0	0	1	0	0	0	0
REINA 52	0	0	0	1	0	0	0	0
FORREST	0	1	0	1	0	0	0	0
PLAYER. 53	1	0	0	1	0	0	0	0
BATARA 54	0	0	0	1	0	0	0	0
TJ S 2043	1	0	0	0	0	0	0	0
A-5780	1	0	0	0	0	0	0	0
OFPEC RJFE	0	1	0	0	0	0	0	0
ACA 731	0	0	0	1	0	0	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	0	0
A-3205	1	0	0	0	0	0	0	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	0	1	0	0
9442	0	0	0	1	0	0	0	0
CARM. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
GRAN. 73	0	1	0	0	0	0	0	0
COBR. FCA	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC NORT	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC CORD	0	0	0	1	0	0	0	0
9501	1	0	0	0	0	0	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	0	0	0	0
CAMIN. 32	1	0	0	0	0	0	0	0
F. CAS. INTA	1	0	0	0	0	0	0	0
RAMSON	0	0	0	1	0	0	0	0
H. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
CARCA. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
CO. FA INTA	1	0	0	0	0	0	0	0
CE FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	0
TANC. INTA	0	0	0	0	1	0	0	0
COPET. 53	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-701 INTA	0	1	0	0	0	0	0	0
SEMIT 500	0	0	0	1	0	0	0	0
A-7306	0	0	0	1	0	0	0	0
TIJER. 42	0	0	0	0	0	0	0	0
TJS 2065	0	0	0	1	0	0	0	0
RO-FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	0
NS-555	0	0	0	1	0	0	0	0
COLOR. 37	1	0	0	0	0	0	0	0
CALAND. 55	0	0	1	0	0	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 48	1	0	0	0	0	0	0	0
ACA 571	0	0	0	1	0	0	0	0
D. EDU 375	1	0	0	0	0	0	0	0
ACA 681	0	1	0	0	0	0	0	0
OFPEC R.627	0	0	0	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	1	0	0	0	0	0	0
PRIMAV. 100	0	0	1	0	0	0	0	0
MAXI. 601	0	0	0	1	0	0	0	0
TRESUR 455	1	0	0	0	0	0	0	0
OFPEC ENTR	0	0	0	0	1	0	0	0
PROMAX 530	1	0	0	0	0	0	0	0
D. EDU 510	0	1	0	0	0	0	0	0
WILLIAMS	1	0	0	0	0	0	0	0

LOCUS	BARC SATT 100				BARC SATT 042				
Grupo de Ligamiento	C2/U19				A1/U07				
PIC	0,43				0,62				
ALELO (pb)	138	144	147	165	160	166	169	172	175
Variedades									
A-7986	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A 5409	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A 6404	0	0	1	0	0	0	1	0	0
NS-641	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A-5401	0	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 49	0	0	1	0	1	0	0	0	0
HOOD 75	0	0	1	0	0	0	0	1	0
RA 587	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A 6381	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A 4702	0	0	0	1	0	0	1	0	0
OFPEC VEN.	0	0	1	0	0	0	1	0	0
NS-642	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TORCACI 58	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A-4656	0	0	0	1	0	0	0	1	0
A-5308	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AVUT. 64	0	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
CHARATA 76	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-4422	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PROMAX 550	0	0	1	0	1	0	0	0	0
GOLOND. 65	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BRAGG	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TJ S 2000	0	0	1	0	0	0	0	1	0
TACUA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
DEK CX 458	0	0	0	1	0	0	0	0	1
COKER 237	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-940 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
DEK CX 690	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A-6443	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 57	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-3910	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	0	1	0	0
MENE. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
M. NAIR 800	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MARTIN. 50	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MONTER. 74	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	0	0	1	0	0	0	0	0	1
TJS 2020	0	0	1	0	0	0	0	1	0
D. FLOR 58	0	0	1	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	0	0	0	1	1	0	0	0	0
A-7894	0	0	1	0	0	0	1	0	0
DEK CX 740	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC PUNT	0	0	1	0	0	0	1	0	0

TUC-G-16	0	0	1	0	0	0	1	0	0
REINA 52	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FORREST	0	0	1	0	0	0	1	0	0
PLAYER. 53	0	0	1	0	0	0	1	0	0
BATARA 54	0	0	1	0	0	1	0	0	0
TJ S 2043	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-5780	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	0	1	0	0	0	1	0	0
ACA 731	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-7372	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-3205	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	0	1	0	0
9442	0	0	0	1	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GRAN. 73	0	0	1	0	0	0	0	1	0
COBR. FCA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC NORT	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC CORD	0	0	0	1	0	0	0	1	0
9501	0	0	1	0	0	0	0	1	0
ORO FCA	0	0	0	1	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	0	0	1	0	0	0	0	1	0
F. CAS. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
RAMSON	0	0	0	1	0	0	0	1	0
H. FA INTA	0	1	1	0	0	1	0	0	0
CARCA. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
CO. FA INTA	0	1	1	0	0	0	0	1	0
CE FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
TANC. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
COPET. 53	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SEMIT 500	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-7306	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TIJER. 42	0	0	1	0	0	0	0	1	0
TJS 2065	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
NS-555	1	0	0	0	0	0	1	0	0
COLOR. 37	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CALAND. 55	0	0	1	0	0	1	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 48	0	0	1	0	0	0	1	0	0
ACA 571	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	0	1	0	0
ACA 681	0	0	0	1	0	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	0	1	0	0	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MAXI. 601	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC ENTR	0	0	1	0	0	0	1	0	0
PROMAX 530	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D. EDU 510	0	0	1	0	0	0	0	1	0
WILLIAMS	0	0	0	1	0	0	0	1	0

LOCUS	BARC SATT 046				BARC SATT 070				
Grupo de Ligamiento	K/U24				B2/U26				
PIC	0,3				0,56				
ALELO (pb)	177	222	228	240	150	153	164	173	176
Variedades									
A-7986	1	0	0	0	0	0	0	1	0
RA 702	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A 5409	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A 6404	1	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-641	1	0	1	0	1	0	0	0	1
A-5401	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 49	0	0	1	0	0	0	1	0	0
HOOD 75	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RA 587	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TORCAZA 63	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A 6381	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A 4702	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-642	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TORCACI 58	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-4656	1	0	0	0	1	0	0	0	1
A-5308	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AVUT. 64	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	0	0	0	1
FED. 1 INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-641 INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-4422	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PROMAX 550	1	1	0	1	1	0	0	0	0
GOLOND. 65	1	0	0	1	1	0	0	0	0
BRAGG	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TJ S 2000	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TACUA INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0
DEK CX 458	1	1	0	0	0	0	0	0	1
COKER 237	1	0	0	0	0	1	0	0	0
FA-940 INTA	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DEK CX 690	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A-6443	1	0	0	0	0	0	0	0	1
D. MARIO 57	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-3910	1	0	0	0	0	0	0	0	1
D. MARIO 50	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MENE. INTA	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M. NAIR 800	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	0	0	0	1
MARTIN. 50	0	1	0	0	1	0	0	0	0
MONTER. 74	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-837 INTA	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TJS 2020	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. FLOR 58	1	0	0	0	1	0	0	0	1
DORADA 48	0	1	0	1	1	0	0	0	0
A-7894	1	0	0	0	1	0	0	0	0
DEK CX 740	1	0	0	0	1	0	1	0	0
OFPEC PUNT	1	0	0	0	1	0	0	0	0

TUC-G-16	1	0	0	0	1	0	0	0	1
REINA 52	0	1	0	0	1	0	0	0	0
FORREST	1	0	0	0	0	0	1	0	1
PLAYER. 53	0	1	0	0	1	0	0	0	0
BATARA 54	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TJ S 2043	0	0	1	0	0	0	0	0	1
A-5780	1	0	0	0	0	0	1	0	1
OFPEC RJFE	1	0	0	0	1	0	0	0	0
ACA 731	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-7372	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-3205	0	0	0	1	1	0	0	0	0
D.MARIO 55	1	1	0	0	1	1	0	0	0
9442	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CARM. INTA	0	1	0	0	0	0	1	0	0
GRAN. 73	1	0	0	0	1	0	0	0	0
COBR. FCA	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OFPEC CORD	1	0	0	0	0	0	1	0	0
9501	0	1	0	0	1	0	0	0	0
ORO FCA	1	0	0	0	0	0	0	1	0
CAMIN. 32	0	1	0	0	0	0	0	0	1
F. CAS. INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RAMSON	1	0	0	0	1	0	0	0	0
H. FA INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CARCA. INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CO. FA INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CE FA INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TANC. INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
COPET. 53	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FA-701 INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
SEMIT 500	1	0	0	0	1	0	0	0	1
A-7306	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TIJER. 42	0	1	0	0	0	0	0	0	1
TJS 2065	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	0	1	0	0
NS-555	1	0	0	0	0	0	1	0	0
COLOR. 37	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CALAND. 55	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FT-11 ALVOR	1	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 48	0	0	0	1	1	0	0	0	0
ACA 571	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. EDU 375	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ACA 681	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OFPEC R.627	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TRESUR 321	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PRIMAV. 100	1	0	0	0	0	0	0	0	1
MAXI. 601	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TRESUR 455	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OFPEC ENTR	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PROMAX 530	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. EDU 510	0	1	0	0	0	0	0	0	1
WILLIAMS	0	1	0	0	0	0	0	0	1

LOCUS	BARC SATT 002				BARC SATT 038		
Grupo de Ligamiento	D2/U12				G/U05		
PIC	0,41				0,44		
ALELO (pb)	127	133	140	145	169	172	177
Variedades							
A-7986	0	1	0	0	0	0	1
RA 702	0	1	0	0	0	0	1
A 5409	1	0	0	0	0	1	0
A 6404	1	0	0	0	0	0	1
NS-641	0	1	0	0	0	1	0
A-5401	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 49	1	0	0	0	0	1	0
HOOD 75	1	0	0	0	0	1	0
RA 587	0	1	0	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	0	1	0
A 6381	1	0	0	0	0	1	0
A 4702	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	0	1	0
NS-642	0	1	0	0	0	1	0
TORCACI 58	0	1	0	0	0	1	0
A-4656	0	1	0	0	0	1	0
A-5308	1	0	0	0	0	1	0
AVUT. 64	0	1	0	0	0	1	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	1	0	0	0	0	1	0
CHARATA 76	0	1	0	0	0	1	0
FA-641 INTA	1	0	0	0	0	0	1
A-4422	1	0	0	0	0	1	0
PROMAX 550	0	1	0	0	0	1	0
GOLOND. 65	1	0	0	0	0	1	0
BRAGG	0	1	0	0	0	1	0
TJ S 2000	1	0	0	0	0	0	1
TACUA INTA	0	1	0	0	0	0	1
DEK CX 458	1	0	0	0	0	1	0
COKER 237	0	1	0	0	0	0	1
FA-940 INTA	1	0	0	0	0	0	1
DEK CX 690	0	0	0	1	0	0	1
A-6443	1	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 57	0	1	0	0	1	0	0
A-3910	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 50	1	0	0	0	0	0	1
MENE. INTA	1	0	0	0	0	1	0
M. NAIR 800	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	1	0
MARTIN. 50	1	0	0	0	0	1	0
MONTER. 74	1	0	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	1	0	1	0	0	0	1
TJS 2020	1	0	0	0	0	1	0
D. FLOR 58	1	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	1	0	0	0	0	0	1
A-7894	1	0	0	0	0	0	1
DEK CX 740	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC PUNT	1	0	0	0	0	0	1

TUC-G-16	1	1	0	0	0	1	0
REINA 52	1	0	0	0	0	0	1
FORREST	0	1	0	0	0	0	1
PLAYER. 53	1	0	0	0	0	1	0
BATARA 54	1	0	0	0	0	1	0
TJ S 2043	1	0	0	0	0	1	0
A-5780	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC RJFE	1	0	0	0	0	1	0
ACA 731	1	0	0	0	0	1	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	1
A-3205	1	0	0	0	0	1	0
D.MARIO 55	1	0	0	0	0	1	0
9442	1	0	0	0	0	1	0
CARM. INTA	1	0	0	0	0	1	0
GRAN. 73	1	0	0	0	0	1	0
COBR. FCA	1	0	0	0	0	0	1
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	0	1
OFPEC CORD	0	1	0	0	0	1	0
9501	1	0	0	0	0	1	0
ORO FCA	1	1	0	0	0	0	1
CAMIN. 32	1	0	0	0	0	1	0
F. CAS. INTA	1	0	0	0	0	1	0
RAMSON	0	1	0	0	1	0	0
H. FA INTA	1	0	0	0	0	1	0
CARCA. INTA	0	1	0	0	0	1	0
CO. FA INTA	1	0	0	0	0	1	0
CE FA INTA	1	0	0	0	0	0	1
TANC. INTA	1	0	0	0	0	1	0
COPET. 53	1	0	0	0	0	1	0
FA-701 INTA	0	1	0	0	0	1	0
SEMIT 500	0	0	0	1	0	1	0
A-7306	1	0	0	0	0	1	0
TIJER. 42	1	0	0	0	0	1	0
TJS 2065	1	0	0	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	1	0	0	0	1	0
NS-555	1	0	0	0	0	1	0
COLOR. 37	1	0	0	0	0	1	0
CALAND. 55	1	0	0	0	0	1	0
FT-11 ALVOR	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 48	0	1	0	0	0	1	0
ACA 571	1	0	0	0	0	1	0
D. EDU 375	1	0	0	0	0	1	0
ACA 681	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC R.627	1	0	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	1	0	0	0	1	0
PRIMAV. 100	0	1	0	0	0	1	0
MAXI. 601	1	0	0	0	0	0	1
TRESUR 455	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC ENTR	1	0	0	0	0	0	1
PROMAX 530	1	0	0	0	0	1	0
D. EDU 510	0	0	0	1	0	1	0
WILLIAMS	1	0	0	0	0	1	0

LOCUS	BARC SATT 001				BARC SATT 177			
Grupo de Ligamiento	K/U24				A2/U03			
PIC	0,36				0,63			
ALELO (pb)	82	108	111	117	108	111	113	120
Variedades								
A-7986	0	1	0	0	0	0	1	0
RA 702	0	1	0	0	1	0	0	0
A 5409	0	1	0	0	0	0	1	0
A 6404	5	5	5	5	0	0	0	1
NS-641	0	1	0	0	0	0	1	0
A-5401	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 49	0	1	0	0	0	0	0	1
HOOD 75	0	0	0	1	0	0	0	1
RA 587	0	1	0	0	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	0	0	1	0
A 6381	0	1	0	0	0	0	1	0
A 4702	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	0	1	0	0
NS-642	0	1	0	0	0	0	0	1
TORCACI 58	0	1	0	0	0	0	0	1
A-4656	0	1	0	0	0	0	1	0
A-5308	0	1	0	0	0	0	1	0
AVUT. 64	1	0	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 43	0	1	0	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	1	0	0	0	0	0	0	1
CHARATA 76	0	1	0	0	0	0	0	1
FA-841 INTA	1	0	0	0	0	1	0	0
A-4422	0	1	0	0	0	0	1	0
PROMAX 550	0	1	0	0	0	0	1	0
GOLOND. 65	0	1	0	0	0	0	0	1
BRAGG	0	1	0	0	0	0	1	0
TJ S 2000	0	1	0	0	0	1	0	0
TACUA INTA	0	0	0	1	0	0	0	1
DEK CX 458	0	1	0	0	0	0	1	0
COKER 237	0	1	0	0	1	0	0	0
FA-940 INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
DEK CX 690	0	1	0	0	0	0	1	0
A-6443	0	1	0	0	0	0	0	1
D. MARIO 57	0	1	0	0	0	0	1	0
A-3910	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 50	0	1	0	0	0	0	1	0
MENE. INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
M. NAIR 800	0	1	0	0	0	0	0	1
OFPEC SANT	0	0	0	1	0	0	1	0
MARTIN. 50	0	1	0	0	0	0	1	0
MONTER. 74	0	1	0	0	1	0	0	0
FA-837 INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
TJS 2020	0	1	0	0	0	1	0	0
D. FLOR 58	0	1	0	1	0	0	0	1
DORADA 48	0	1	0	1	0	0	1	0
A-7894	0	0	1	0	1	0	0	0

DEK CX 740	1	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC PUNT	0	1	0	0	0	0	1	0
TUC-G-16	0	1	0	0	1	0	0	0
REINA 52	0	0	0	1	0	0	1	0
FORREST	0	1	0	0	0	0	1	0
PLAYER. 53	0	0	0	1	0	0	1	0
BATARA 54	0	1	0	0	0	0	1	0
TJ S 2043	0	1	0	0	0	0	0	1
A-5780	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	1	0	0	0	0	1	0
ACA 731	0	1	0	0	0	1	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	1	0
A-3205	0	1	0	0	0	0	1	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	0	1	1	0
9442	0	1	0	0	0	0	1	0
CARM. INTA	0	0	0	1	0	1	0	0
GRAN. 73	0	1	0	0	0	0	1	0
COBR. FCA	0	1	0	0	1	0	0	0
OFPEC NORT	0	1	0	0	0	0	1	1
OFPEC CORD	0	1	0	0	0	1	0	0
9501	0	0	0	1	0	0	1	0
ORO FCA	0	1	0	0	0	0	0	1
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	0	1	0
F. CAS. INTA	0	1	0	0	0	0	0	1
RAMSON	5	5	5	5	0	0	0	1
H. FA INTA	0	0	0	1	0	1	0	0
CARCA. INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
CO. FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	1
CE FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	1
TANC. INTA	0	1	0	0	0	0	1	0
COJET. 53	0	1	0	0	0	0	1	0
FA-701 INTA	0	1	0	0	0	0	1	0
SEMIT 500	0	1	0	0	0	0	1	0
A-7306	0	1	0	0	1	0	0	0
TIJER. 42	0	0	0	1	0	0	1	0
TJS 2065	0	0	0	1	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	1
NS-555	0	1	0	0	0	0	1	0
COLOR. 37	0	1	0	0	0	0	1	0
CALAND. 55	0	1	0	0	0	0	1	0
FT-11 ALVOR	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 48	0	0	1	0	0	0	1	1
ACA 571	0	0	0	1	0	1	0	0
D. EDU 375	0	1	0	0	0	0	1	0
ACA 681	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC R.627	0	1	0	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	1	0	0	0	0	1	0
PRIMAV. 100	0	1	0	0	0	0	1	0
MAXI. 601	0	1	0	0	0	0	0	1
TRESUR 455	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC ENTR	0	1	0	0	0	0	0	1
PROMAX 530	0	1	0	0	0	0	1	0
D. EDU 510	0	1	0	0	0	0	0	1
WILLIAMS	0	0	0	1	0	0	1	0

LOCUS	BARC SATT 226				BARC SATT 294			
Grupo de Ligamiento	D2/U12				C1/U22			
PIC	0,65				0,56			
ALELO (pb)	300	313	325	331	244	278	287	290
Variedades								
A-7986	0	0	1	0	1	0	0	0
RA 702	0	0	0	1	0	1	0	0
A 5409	0	0	1	0	1	0	0	0
A 6404	0	1	0	0	1	0	0	0
NS-641	0	0	1	0	0	1	0	0
A-5401	0	1	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 49	0	0	1	0	0	0	0	1
HOOD 75	0	0	0	1	1	0	0	0
RA 587	0	0	0	1	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	1	0	0
A 6381	0	1	0	0	1	0	0	0
A 4702	0	0	1	0	1	0	0	0
OFPEC VEN.	0	0	1	0	1	0	0	0
NS-642	0	0	0	1	0	0	1	0
TORCACI 58	0	0	1	0	1	0	0	0
A-4656	0	1	0	0	1	0	0	0
A-5308	0	0	1	0	1	0	0	0
AVUT. 64	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 43	0	1	0	0	1	0	0	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	1	0	0	0
CHARATA 76	0	0	1	0	0	0	1	0
FA-841 INTA	1	0	0	0	0	0	1	0
A-4422	0	0	1	0	1	0	0	0
PROMAX 550	0	1	0	0	1	0	0	0
GOLOND. 65	0	1	0	0	0	0	0	1
BRAGG	0	0	0	1	0	1	0	0
TJ S 2000	0	0	0	1	1	0	0	0
TACUA INTA	0	0	1	0	1	0	0	0
DEK CX 458	0	1	0	0	1	0	0	0
COKER 237	0	0	0	1	1	0	0	0
FA-940 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0
DEK CX 690	0	0	1	0	0	1	0	0
A-6443	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 57	0	0	1	0	1	0	0	0
A-3910	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 50	0	1	0	0	1	0	0	0
MENE. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0
M. NAIR 800	0	1	0	0	1	0	0	0
OFPEC SANT	0	0	1	0	1	0	0	0
MARTIN. 50	0	1	0	0	1	0	0	0
MONTER. 74	0	1	0	0	1	0	0	0
FA-837 INTA	0	0	0	1	1	0	0	0
TJS 2020	0	0	0	1	1	0	0	0
D. FLOR 58	0	0	0	1	1	0	0	0
DORADA 48	0	1	0	0	1	0	0	0
A-7894	0	0	0	1	0	1	0	0
DEK CX 740	0	0	1	0	1	0	0	0

OFPEC PUNT	0	1	0	0	1	0	0	0
TUC-G-16	0	0	0	1	1	0	0	0
REINA 52	0	1	0	0	1	0	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	1	0	0
PLAYER. 53	0	0	1	0	1	0	0	0
BATARA 54	0	1	0	0	0	0	1	0
TJ S 2043	0	0	1	0	1	0	0	0
A-5780	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	1	0	1	1	0	0	0
ACA 731	0	0	1	0	0	1	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	1	0	0
A-3205	0	1	0	0	0	0	0	1
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	1	0	0
9442	0	1	0	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
GRAN. 73	0	0	0	1	0	1	0	0
COBR. FCA	0	1	0	0	1	0	0	0
OFPEC NORT	0	0	0	1	1	0	0	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	1	0	0	0
9501	0	0	1	0	1	0	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	1	0	0	0
CAMIN. 32	0	0	1	0	0	0	1	0
F. CAS. INTA	0	0	0	1	1	0	0	0
RAMSON	0	1	0	0	0	1	0	0
H. FA INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
CARCA. INTA	0	0	0	1	1	0	0	0
CO. FA INTA	0	0	1	1	1	0	0	0
CE FA INTA	0	1	0	0	0	0	1	0
TANC. INTA	0	0	1	0	1	0	0	0
COPET. 53	0	0	1	0	1	0	0	0
FA-701 INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
SEMIT 500	0	0	1	0	1	0	0	0
A-7306	0	0	0	1	0	1	0	0
TIJER. 42	0	0	1	0	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	1	0	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	0	1	0	1	0	0	0
NS-555	0	1	0	0	1	0	0	0
COLOR. 37	0	1	0	0	1	0	0	0
CALAND. 55	0	0	0	1	0	0	1	0
FT-11 ALVOR	5	5	5	5	0	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	1	0	1	0	0	0
ACA 571	5	5	5	5	1	0	0	0
D. EDU 375	5	5	5	5	1	0	0	0
ACA 681	0	0	0	1	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	1	0	0	1	0	0	0
TRESUR 321	0	0	0	1	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	0	1	0	0	0	1	0
MAXI. 601	0	0	0	1	1	0	0	0
TRESUR 455	0	0	1	0	1	0	0	0
OFPEC ENTR	0	0	0	1	1	0	0	0
PROMAX 530	0	1	0	0	1	0	0	0
D. EDU 510	0	0	1	0	0	1	0	0
WILLIAMS	0	0	1	0	0	0	1	0

LOCUS	BARC SATT 253				BARC SATT 231				
Grupo de Ligamiento	H/U10				E/U18+ U02				
PIC	0,56				0,68				
ALELO (pb)	135	144	147	153	216	219	222	231	243
Variedades									
A-7986	1	0	0	0	1	0	0	0	0
RA 702	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A 5409	0	0	1	0	0	0	0	0	1
A 6404	1	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-641	0	0	1	0	1	0	0	0	1
A-5401	0	0	0	1	1	0	0	0	0
D. MARIO 49	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HOOD 75	1	0	0	0	0	1	0	0	0
RA 587	0	0	1	0	1	0	0	0	0
TORCAZA 63	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A 6381	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A 4702	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	1	0	0	0	0
NS-642	0	0	1	0	1	0	0	0	0
TORCACI 58	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A-4656	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A-5308	0	0	1	0	1	0	0	0	0
AVUT. 64	0	0	1	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 43	0	0	1	0	1	0	0	0	0
FED. 1 INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
CHARATA 76	0	0	1	0	0	1	0	0	0
FA-841 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-4422	0	0	1	0	0	0	0	0	1
PROMAX 550	0	0	1	0	0	0	0	0	1
GOLOND. 65	0	0	1	0	0	0	0	0	1
BRAGG	0	0	1	0	0	1	0	0	0
TJ S 2000	0	0	1	0	0	1	0	0	0
TACUA INTA	0	0	1	0	0	0	1	0	0
DEK CX 458	0	0	1	0	0	0	0	0	1
COKER 237	1	0	0	0	0	1	0	0	0
FA-940 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
DEK CX 690	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-6443	0	0	1	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 57	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-3910	0	0	1	0	1	0	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	1	0	1	0	0	0	0
MENE. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
M. NAIR 800	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OFPEC SANT	0	0	1	0	1	0	0	0	0
MARTIN. 50	0	0	1	0	0	0	0	0	1
MONTER. 74	0	0	1	0	0	1	0	0	0
FA-837 INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0
TJS 2020	0	0	1	0	0	1	0	0	0
D. FLOR 58	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DORADA 48	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-7894	0	0	1	0	0	1	0	0	0
DEK CX 740	0	0	1	0	0	0	1	0	0

OFPEC PUNT	0	0	1	0	0	1	0	0	0
TUC-G-16	1	0	0	0	0	0	0	1	0
REINA 52	0	0	1	0	0	0	0	0	1
FORREST	0	0	1	0	0	1	1	0	0
PLAYER. 53	0	0	1	0	0	1	0	0	0
BATARA 54	0	0	1	0	0	1	0	0	0
TJ S 2043	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A-5780	0	0	1	0	0	1	0	0	0
OFPEC RJFE	1	0	0	0	0	1	0	0	0
ACA 731	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A-7372	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-3205	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D.MARIO 55	0	0	1	0	0	1	0	0	0
9442	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CARM. INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
GRAN. 73	0	1	0	0	1	0	0	0	0
COBR. FCA	0	1	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	0	0	1	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	0	1	0	0	0
9501	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ORO FCA	5	5	5	5	0	1	0	0	0
CAMIN. 32	0	0	1	0	0	0	0	0	1
F. CAS. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RAMSON	0	0	1	0	1	0	0	0	0
H. FA INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
CARCA. INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
CO. FA INTA	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CE FA INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
TANC. INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
COPET. 53	0	0	1	0	1	0	0	0	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
SEMIT 500	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A-7306	0	0	1	0	1	0	0	0	0
TIJER. 42	0	0	1	0	0	0	0	0	1
TJS 2065	0	0	1	0	1	0	0	0	0
RO-FA INTA	1	0	0	0	0	1	0	0	0
NS-555	0	0	1	0	1	0	0	0	0
COLOR. 37	0	0	0	1	0	0	0	0	1
CALAND. 55	0	0	0	1	1	0	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 48	0	0	1	0	1	0	0	0	0
ACA 571	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	0	0	0	1
ACA 681	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OFPEC R.627	0	1	0	0	0	1	0	0	0
TRESUR 321	0	0	1	0	0	1	0	0	0
PRIMAV. 100	0	0	0	1	1	0	0	0	0
MAXI. 601	1	0	0	0	0	1	0	0	0
TRESUR 455	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OFPEC ENTR	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PROMAX 530	0	0	1	0	0	0	0	0	1
D. EDU 510	0	0	1	0	0	1	0	0	0
WILLIAMS	0	0	0		0	0	0	0	1

LOCUS	BARC SATT 353			BARC SATT 175			
Grupo de Ligamiento	H/U10			M/U11			
PIC	0,58			0,62			
ALELO (pb)	111	115	126	155	165	171	179
Variedades							
A-7986	0	0	1	0	0	1	0
RA 702	1	0	0	0	0	0	1
A 5409	0	0	1	0	0	1	0
A 6404	0	0	1	0	0	1	0
NS-641	1	0	0	0	1	0	0
A-5401	0	0	1	0	0	1	0
D. MARIO 49	0	0	1	1	0	0	0
HOOD 75	1	0	0	0	0	1	0
RA 587	1	0	0	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	0	0	1
A 6381	0	0	1	0	0	1	0
A 4702	0	1	0	0	0	1	0
OFPEC VEN.	0	0	1	1	0	0	0
NS-642	1	0	0	0	0	0	1
TORCACI 58	0	0	1	0	0	0	1
A-4656	0	1	0	0	0	1	0
A-5308	0	0	1	0	0	1	0
AVUT. 64	0	0	1	0	0	0	1
D. MARIO 43	0	1	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	0	1	0
CHARATA 76	1	0	0	0	0	0	1
FA-841 INTA	0	0	1	0	0	0	1
A-4422	0	0	1	0	1	0	0
PROMAX 550	0	0	1	1	0	1	0
GOLOND. 65	0	0	1	0	0	1	0
BRAGG	0	1	0	0	0	0	1
TJ S 2000	0	0	1	0	0	0	1
TACUA INTA	1	0	0	0	0	0	1
DEK CX 458	0	1	0	0	0	1	0
COKER 237	0	0	1	0	0	0	1
FA-940 INTA	1	0	0	0	0	1	0
DEK CX 690	0	0	1	0	0	1	0
A-6443	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 57	1	0	0	0	0	0	1
A-3910	1	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 50	0	0	1	0	0	1	0
MENE. INTA	0	1	0	5	5	5	5
M. NAIR 800	0	0	1	0	0	0	1
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	1	0
MARTIN. 50	0	0	1	0	0	1	0
MONTER. 74	0	1	0	0	0	0	1
FA-837 INTA	0	0	1	0	0	1	0
TJS 2020	1	0	0	0	0	0	1
D. FLOR 58	1	0	0	0	0	1	0
DORADA 48	1	0	0	1	0	1	0
A-7894	0	0	1	0	0	0	1
DEK CX 740	0	0	1	0	0	0	1

OFPEC PUNT	0	0	1	0	0	0	1
TUC-G-16	1	0	0	1	0	0	0
REINA 52	1	0	0	0	0	1	0
FORREST	0	0	1	0	0	0	1
PLAYER. 53	0	0	1	0	0	1	0
BATARA 54	0	1	0	0	0	1	0
TJ S 2043	0	1	0	1	0	0	0
A-5780	1	0	0	0	0	0	1
OFPEC RJFE	1	0	0	0	0	0	1
ACA 731	0	0	1	0	0	1	0
A-7372	0	0	1	0	0	0	1
A-3205	0	0	1	0	0	1	0
D.MARIO 55	0	1	0	0	0	0	1
9442	0	0	1	0	0	1	0
CARM. INTA	1	0	0	0	0	1	0
GRAN. 73	0	0	1	0	0	1	0
COBR. FCA	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC CORD	1	0	0	0	0	1	0
9501	0	0	1	0	0	1	0
ORO FCA	1	0	0	0	0	0	1
CAMIN. 32	0	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	1	0	0	0	1	0	0
RAMSON	0	0	1	0	0	1	0
H. FA INTA	1	0	0	0	0	1	0
CARCA. INTA	1	0	0	0	0	1	0
CO. FA INTA	1	0	0	0	0	0	1
CE FA INTA	1	0	0	0	0	0	1
TANC. INTA	1	0	0	0	0	1	0
COPET. 53	0	1	0	0	0	1	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	1	0
SEMIT 500	0	1	0	0	1	0	0
A-7306	0	0	1	0	0	0	1
TIJER. 42	0	0	1	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	1	0	0	1	0
RO-FA INTA	0	0	1	0	0	0	1
NS-555	0	0	1	1	0	0	0
COLOR. 37	0	0	1	0	0	1	0
CALAND. 55	0	0	1	0	0	0	1
FT-11 ALVOR	0	0	1	0	0	1	0
D. MARIO 48	1	0	0	1	0	0	0
ACA 571	1	0	0	0	1	0	0
D. EDU 375	0	0	1	0	1	0	0
ACA 681	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC R.627	1	0	0	0	1	0	0
TRESUR 321	0	0	1	0	0	0	1
PRIMAV. 100	0	0	1	0	1	0	0
MAXI. 601	1	0	0	0	0	1	0
TRESUR 455	0	0	1	0	1	0	0
OFPEC ENTR	1	0	0	0	0	1	0
PROMAX 530	0	1	1	0	0	1	0
D. EDU 510	1	0	1	0	0	0	1
WILLIAMS	0	0	1	0	1	0	0

LOCUS	BARC SATT 173					BARC SATT 168			
Grupo de Ligamiento	O/U21					B2/U26			
PIC	0,62					0,56			
ALELO (pb)	198	207	236	245	257	227	230	233	236
Variedades									
A-7986	0	0	0	1	0	0	0	1	0
RA 702	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A 5409	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A 6404	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NS-641	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A-5401	1	0	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 49	0	0	0	1	0	0	0	1	0
HOOD 75	0	0	0	1	0	0	0	1	0
RA 587	1	0	0	0	0	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	0	0	1	0	0	0	1	0
A 6381	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A 4702	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OFPEC VEN.	1	0	0	0	0	0	0	1	0
NS-642	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TORCADI 58	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-4656	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-5308	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AVUT. 64	0	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0
CHARATA 76	0	0	0	0	1	0	0	1	0
FA-841 INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-4422	1	0	0	0	0	1	0	0	0
PROMAX 550	0	0	0	1	0	1	0	0	0
GOLOND. 65	1	0	0	0	0	1	0	0	0
BRAGG	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TJ S 2000	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TACUA INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0
DEK CX 458	1	0	0	0	0	1	0	0	0
COKER 237	0	0	0	0	1	0	0	1	0
FA-940 INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0
DEK CX 690	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-6443	0	1	0	0	0	0	0	1	0
D. MARIO 57	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A-3910	1	0	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	1	0	1	0	0	0
MENE. INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0
M. NAIR 800	0	0	0	1	0	0	0	1	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MARTIN. 50	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MONTER. 74	0	0	0	1	0	0	0	1	0
FA-837 INTA	0	0	0	0	1	0	0	0	1
TJS 2020	0	0	0	1	0	0	0	1	0
D. FLOR 58	0	0	0	1	0	0	0	1	0
DORADA 48	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A-7894	0	0	0	0	1	0	0	1	0
DEK CX 740	0	0	0	1	0	1	0	0	0

OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	1	0	0	0
TUC-G-16	0	0	0	0	1	0	0	1	0
REINA 52	1	0	0	0	0	1	0	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	1	0	0	0
PLAYER. 53	1	0	0	0	0	1	0	0	0
BATARA 54	0	0	0	1	0	1	0	0	0
TJ S 2043	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A-5780	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OFPEC RJFE	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ACA 731	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A-7372	0	0	0	1	0	0	0	1	0
A-3205	1	0	0	0	0	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	1	0	0	0
9442	0	0	0	1	0	1	0	0	0
CARM. INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0
GRAN. 73	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COBR. FCA	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OFPEC NORT	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OFPEC CORD	0	1	0	0	0	0	0	1	0
9501	1	0	0	0	0	1	0	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	1	0	0	0	0	1	0	0	0
F. CAS. INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0
RAMSON	0	0	0	1	0	0	0	1	0
H. FA INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0
CARCA. INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0
CO. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0
CE FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TANC. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0
COPE. 53	0	0	0	1	0	0	0	1	0
FA-701 INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0
SEMIT 500	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-7306	5	5	5	5	5	0	0	1	0
TIJER. 42	1	0	0	0	0	1	0	0	0
TJS 2065	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RO-FA INTA	0	1	0	0	0	1	0	0	0
NS-555	0	0	0	1	0	1	0	0	0
COLOR. 37	1	0	0	0	0	1	0	0	0
CALAND. 55	0	0	0	1	0	0	0	1	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	1	0	1	0	0	0
D. MARIO 48	1	0	0	0	0	0	0	1	0
ACA 571	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D. EDU 375	1	0	0	0	0	1	0	0	0
ACA 681	0	0	0	1	0	0	0	1	0
OFPEC R.627	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TRESUR 321	0	0	0	1	0	0	0	1	0
PRIMAV. 100	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MAXI. 601	1	0	0	0	0	0	0	1	0
TRESUR 455	0	0	0	1	0	1	0	0	0
OFPEC ENTR	0	0	0	1	0	0	0	1	0
PROMAX 530	1	0	0	0	0	1	0	0	0
D. EDU 510	0	0	0	1	0	1	0	0	0
WILLIAMS	1	0	0	0	0	1	0	0	0

LOCUS	BARC SATT 534							BARC SATT 577		
Grupo de Ligamiento	B2/U26							B2/U26		
PIC	0,72							0,62		
ALELO (pb)	236	244	250	257	260	266	269	115	119	123
Variedades										
A-7986	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A 5409	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A 6404	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
NS-641	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A-5401	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
D. MARIO 49	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
HOOD 75	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RA 587	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A 6381	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A 4702	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
OFPEC VEN.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
NS-642	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
TORCACI 58	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A-4656	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A-5308	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
AVUT. 64	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 43	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
FED. 1 INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-4422	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
PROMAX 550	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
GOLOND. 65	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BRAGG	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
TJ S 2000	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TACUA INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
DEK CX 458	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COKER 237	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
FA-940 INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
DEK CX 690	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
A-6443	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
D. MARIO 57	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A-3910	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
D. MARIO 50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MENE. INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
M. NAIR 800	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
MARTIN. 50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
MONTER. 74	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
FA-837 INTA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TJS 2020	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
D. FLOR 58	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
DORADA 48	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A-7894	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
DEK CX 740	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

OFPEC PUNT	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TUC-G-16	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
REINA 52	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
FORREST	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
PLAYER. 53	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BATARA 54	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
TJ S 2043	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
A-5780	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
OFPEC RJFE	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ACA 731	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-3205	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
D.MARIO 55	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
9442	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
GRAN. 73	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
COBR. FCA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC CORD	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9501	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ORO FCA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
F. CAS. INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
RAMSON	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
H. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
CARCA. INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
CO. FA INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
CE FA INTA	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TANC. INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
COPET. 53	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
FA-701 INTA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SEMIT 500	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A-7306	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
TIJER. 42	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TJS 2065	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
RO-FA INTA	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NS-555	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
COLOR. 37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
CALAND. 55	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
FT-11 ALVOR	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ACA 571	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D. EDU 375	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ACA 681	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC R.627	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TRESUR 321	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PRIMAV. 100	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
MAXI. 601	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OFPEC ENTR	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
PROMAX 530	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
D. EDU 510	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
WILLIAMS	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

LOCUS	BARC SATT 414						BARC SATT 172			
Grupo de Ligamiento	J/U01						D1b+W /U19			
PIC	0,80						0,50			
ALELO (pb)	260	289	295	301	304	312	221	224	230	236
Variedades										
A-7986	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A 5409	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A 6404	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NS-641	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A-5401	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 49	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
HOOD 75	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
RA 587	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TORCAZA 63	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
A 6381	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A 4702	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
OFPEC VEN.	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
NS-642	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TORCACI 58	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A-4656	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-5308	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
AVUT. 64	0	0	0	0	1	0	5	5	5	5
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A-4422	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
PROMAX 550	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
GOLOND. 65	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
BRAGG	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
TJ S 2000	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
TACUA INTA	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
DEK CX 458	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
COKER 237	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
FA-940 INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
DEK CX 690	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A-6443	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 57	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
A-3910	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D. MARIO 50	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
MENE. INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
M. NAIR 800	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
MARTIN. 50	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
MONTER. 74	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
TJS 2020	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
D. FLOR 58	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A-7894	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
DEK CX 740	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TUC-G-16	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
REINA 52	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
PLAYER. 53	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BATARA 54	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TJ S 2043	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A-5780	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC RJFE	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
ACA 731	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A-3205	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9442	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
GRAN. 73	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
COBR. FCA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC CORD	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
9501	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ORO FCA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
F. CAS. INTA	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
RAMSON	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
H. FA INTA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
CARCA. INTA	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
CO. FA INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CE FA INTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TANC. INTA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
COPE. 53	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
FA-701 INTA	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
SEMIT 500	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A-7306	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
TIJER. 42	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
TJS 2065	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RO-FA INTA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
NS-555	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
COLOR. 37	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
CALAND. 55	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ACA 571	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ACA 681	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
TRESUR 321	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MAXI. 601	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OFPEC ENTR	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
PROMAX 530	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
D. EDU 510	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
WILLIAMS	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

LOCUS	BARC SATT 259					BARC SATT 358 BARC SATT 357				
Grupo de Ligamiento	O/U21					O/U21		C2/U09		
PIC	0,66					0,40		0,49		
ALELO (pb)	127	133	145	151	154	350	356	215	227	319
Variedades										
A-7986	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
RA 702	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
A 5409	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A 6404	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
NS-641	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
A-5401	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
D. MARIO 49	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
HOOD 75	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
RA 587	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
TORCAZA 63	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
A 6381	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A 4702	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
OFPEC VEN.	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
NS-642	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
TORCACI 58	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A-4656	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A-5308	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
AVUT. 64	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
D. MARIO 43	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CHARATA 76	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FA-641 INTA	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
A-4422	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
PROMAX 550	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
GOLOND. 65	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BRAGG	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
TJ S 2000	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
TACUA INTA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
DEK CX 458	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
COKER 237	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FA-940 INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
DEK CX 690	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
A-6443	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
D. MARIO 57	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
A-3910	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
D. MARIO 50	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
MENE. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
M. NAIR 800	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
OFPEC SANT	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
MARTIN. 50	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
MONTER. 74	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
FA-837 INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
TJS 2020	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
D. FLOR 58	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
DORADA 48	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
A-7894	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
DEK CX 740	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
TUC-G-16	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
REINA 52	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
FORREST	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
PLAYER. 53	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
BATARA 54	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
TJ S 2043	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A-5780	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
OFPEC RJFE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
ACA 731	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
A-7372	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
A-3205	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
9442	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
GRAN. 73	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
COBR. FCA	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
OFPEC NORT	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
OFPEC CORD	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
9501	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
ORO FCA	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
RAMSON	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
H. FA INTA	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
CARCA. INTA	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CO. FA INTA	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
CE FA INTA	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
TANC. INTA	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
COPET. 53	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
FA-701 INTA	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
SEMIT 500	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A-7306	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
TIJER. 42	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
TJS 2065	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
RO-FA INTA	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
NS-555	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
COLOR. 37	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
CALAND. 55	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
FT-11 ALVOR	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
D. MARIO 48	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
ACA 571	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
ACA 681	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
OFPEC R.627	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
TRESUR 321	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
PRIMAV. 100	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
MAXI. 601	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
TRESUR 455	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
OFPEC ENTR	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
PROMAX 530	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
D. EDU 510	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
WILLIAMS	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0

LOCUS	BARC SATT 324				BARC SATT 249			
Grupo de Ligamiento	G/U05				J/U01			
PIC	0,67				0,46			
ALELO (pb)	225	228	231	241	227	251	254	257
Variedades								
A-7986	1	0	0	0	0	1	0	0
RA 702	0	0	0	1	0	1	0	0
A 5409	1	0	0	0	0	1	0	0
A 6404	1	0	0	0	0	1	0	0
NS-641	1	0	0	0	0	1	0	0
A-5401	1	0	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 49	0	0	0	1	0	0	1	0
HOOD 75	0	1	0	0	0	1	0	0
RA 587	0	1	0	0	0	0	1	0
TORCAZA 63	0	1	0	0	0	0	1	0
A 6381	1	0	0	0	0	0	1	0
A 4702	1	0	0	0	0	1	0	0
OFPEC VEN.	0	1	0	0	0	1	0	0
NS-642	0	0	0	1	0	1	0	0
TORCACI 58	0	1	0	0	0	1	0	0
A-4656	1	0	0	0	0	1	0	0
A-5308	1	0	0	0	0	1	0	0
AVUT. 64	0	0	1	0	0	0	1	0
D. MARIO 43	1	0	0	0	0	1	0	0
FED. 1 INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
CHARATA 76	0	0	0	1	0	1	0	0
FA-841 INTA	0	0	0	1	0	1	0	0
A-4422	0	0	0	1	0	1	0	0
PROMAX 550	1	0	0	0	0	1	0	0
GOLOND. 65	1	0	0	0	0	0	1	0
BRAGG	0	0	0	1	0	1	0	0
TJ S 2000	0	1	0	0	0	0	1	0
TACUA INTA	0	1	0	0	1	0	0	0
DEK CX 458	0	0	0	1	0	1	0	0
COKER 237	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-940 INTA	1	0	0	0	0	0	0	1
DEK CX 690	1	0	0	0	0	1	0	0
A-6443	1	0	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 57	1	0	0	0	0	1	0	0
A-3910	1	0	0	0	0	1	0	0
D. MARIO 50	0	1	0	0	0	1	0	0
MENE. INTA	1	0	0	0	0	0	0	1
M. NAIR 800	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC SANT	1	0	0	0	0	1	0	0
MARTIN. 50	1	0	0	0	0	1	0	0
MONTER. 74	0	1	0	0	0	1	0	0
FA-837 INTA	0	1	0	0	0	0	0	1
TJS 2020	0	1	0	0	0	0	1	0
D. FLOR 58	0	1	0	0	0	1	0	0
DORADA 48	1	0	0	0	0	0	1	0
A-7894	0	1	0	0	0	0	0	1
DEK CX 740	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC PUNT	0	0	0	1	0	1	0	0

TUC-G-16	0	0	0	1	0	0	1	0
REINA 52	0	1	0	0	0	1	0	0
FORREST	0	0	0	1	0	1	0	0
PLAYER. 53	0	1	0	0	0	1	0	0
BATARA 54	0	1	0	0	0	0	1	0
TJ S 2043	5	5	5	5	1	0	0	0
A-5780	0	0	0	1	0	0	1	0
OFPEC RJFE	0	0	0	1	0	1	0	0
ACA 731	0	1	0	0	0	1	0	0
A-7372	0	1	0	0	0	0	0	1
A-3205	0	0	0	1	0	1	0	0
D.MARIO 55	0	0	1	0	0	1	0	0
9442	1	0	0	0	0	1	0	0
CARM. INTA	0	0	0	1	0	1	0	0
GRAN. 73	0	1	0	0	0	0	1	0
COBR. FCA	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC NORT	1	0	0	0	0	1	0	1
OFPEC CORD	1	0	0	0	0	0	1	0
9501	0	1	0	0	0	1	0	0
ORO FCA	1	0	0	0	0	1	0	0
CAMIN. 32	0	0	0	1	0	1	0	0
F. CAS. INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
RAMSON	0	1	0	0	0	0	1	0
H. FA INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
CARCA. INTA	1	0	0	0	0	1	1	0
CO. FA INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
CE FA INTA	0	1	0	0	0	0	1	0
TANC. INTA	5	5	5	5	0	0	1	0
COPET. 53	1	0	0	0	0	1	0	0
FA-701 INTA	1	0	0	0	0	1	0	0
SEMIT 500	1	0	0	0	0	1	0	0
A-7306	0	1	0	0	0	0	0	1
TIJER. 42	0	0	0	1	0	1	0	0
TJS 2065	1	0	0	0	0	1	0	0
RO-FA INTA	0	1	0	0	0	1	0	0
NS-555	1	0	0	0	0	0	1	0
COLOR. 37	0	0	0	1	0	1	0	0
CALAND. 55	5	5	5	5	1	0	0	0
FT-11 ALVOR	1	0	0	0	0	0	0	1
D. MARIO 48	0	0	0	1	0	1	0	0
ACA 571	0	0	0	1	0	1	0	0
D. EDU 375	0	0	0	1	0	1	0	0
ACA 681	0	1	0	0	0	1	0	0
OFPEC R.627	0	1	0	0	0	1	0	0
TRESUR 321	0	0	0	1	0	1	0	0
PRIMAV. 100	0	0	0	1	0	1	0	0
MAXI. 601	0	1	0	0	0	1	0	0
TRESUR 455	0	0	0	1	0	1	0	0
OFPEC ENTR	0	1	0	0	0	1	0	0
PROMAX 530	1	0	0	0	0	0	1	0
D. EDU 510	1	0	0	0	5	5	5	5
WILLIAMS	0	0	0	1	0	1	0	0

3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Dos aspectos son necesarios para evaluar la capacidad relativa que tienen los distintos marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad genética: eficiencia para detectar polimorfismo en el pool genético (índices de contenido polimórfico) y capacidad de los diferentes ensayos para determinar la relación genética entre las variedades.

3.1 Eficiencia de los marcadores moleculares para detectar variabilidad genética

Con el fin de estimar la capacidad de los diferentes marcadores moleculares para detectar variabilidad genética, se calcularon los PICs, según lo explicado en Materiales y Métodos (sección análisis de datos) y de acuerdo a lo descrito por Powell y Rafalski *et al.* (1996) y Milbourne *et al.* (1997).

Para el caso de AFLP y RAPD (marcadores de visualización dominantes) cada banda fue considerada como perteneciente a un *locus* simple e independiente, mientras que para SSR (marcadores de visualización co-dominante) cada combinación de “primers” fue considerada como un *locus* simple (e independiente).

La eficiencia de los distintos marcadores moleculares es la que se obtiene del balance entre el nivel de polimorfismo detectado (PIC) y la capacidad que tenga el ensayo de detectar múltiples polimorfismos (Powell *et al.* , 1996).

Considerando el resultado de la utilización de 22 “primers” seleccionados de RAPD, se produjo un total de 160 productos de amplificación claramente visibles, con un promedio de 5.16 bandas por ensayo, de las cuales el 19.3% (31 bandas) evidenciaron polimorfismos. Utilizando 5 combinaciones de “primers” con la técnica de AFLP, se obtuvieron 189 productos totales diferentes, con un promedio de 37.8 bandas por combinación de “primers”, de las cuales el 17% (32 bandas) evidenciaron polimorfismos. Los 30 SSR analizados, mostraron 132 productos diferentes, con un promedio de 4.4 bandas por ensayo, de las cuales el 99.24% (131 bandas) evidenciaron polimorfismos.

El índice más alto de polimorfismo se observó con la técnica de SSR (PIC = 0.601), mientras que la técnica de AFLP arrojó el índice más bajo (PIC = 0.255). En el caso de los RAPD, el índice fue relativamente más alto que para los AFLP (PIC = 0.385). Estos datos se resumen en la **Tabla IX**.

Tabla IX: Comparación de los promedios PIC para cada tipo de marcador molecular y su varianza (Var). Se especifica el número de ensayos realizados por cada marcador, número total de bandas obtenidas, número de bandas polimórficas, bandas obtenidas por ensayo y porcentaje de polimorfismo.

Marcador Molecular	Número de ensayos	Número total de bandas	Número de bandas polimórf.	Bandas por ensayo	% de polimorf.	PICs	Var.
RAPD	31	160	31	5,16	19,3	0,385	0,0141
AFLP	5	189	32	37,8	17	0,255	0,0323
SSR	30	132	131	4,4	99,24	0,601	0,0153

PIC = Índice de contenido polimórfico

Var = Varianza

3.2 Relación genética entre variedades de soja

Se construyó la matriz básica de datos (MBD) tanto para las características morfológicas y como para cada tipo de marcador molecular (RAPD, AFLP y SSR), transformando todos los datos a una codificación doble-estado, “presencia/ausencia” (también considerada como “todo o nada”) (Walker, 1968; Bunge, 1969; Cohen y Nagel, 1971; Sneath y Sokal, 1973; Clifford y Stephenson, 1975).

Partiendo de la MBD se obtuvieron las matrices de similitud genética con el programa NTSYS-PC y el coeficiente de similitud de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973), según lo explicado en Materiales y Métodos.

Posteriormente con el resultado obtenido de cada una de las matrices de similitud se realizó un “análisis de agrupamiento”

utilizando el sistema de la media aritmética no ponderada, UPGMA (Rohlf F. J., 1992).

El resultado de éste análisis, se representó en forma de dendrograma, que muestra la relación en grados de similitud entre dos variedades o grupos de variedades.

Las técnicas que se utilizan para la construcción de los dendrogramas no reflejan en forma exacta la información de la matriz de similitud, ya que se producen distorsiones de las relaciones de las mismas al realizar una representación bidimensional. Por esta razón se construyeron las matrices de similitud para cada sistema a partir de los valores del dendrograma, las cuales se denominan matrices cofenéticas.

Con los valores de similitud genética determinada por cada una de las matrices de similitud y matrices cofenéticas, se calculó el valor promedio de similitud genética determinado por cada tipo de marcador molecular y para las características morfológicas, con el fin de observar el grado de variabilidad genética.

De esta manera se observa que el promedio de similitud genética entre genotipos resultó ser más bajo utilizando SSR (0.262). En el caso de marcadores de visualización dominante, como ser los RAPD y AFLP, los valores fueron prácticamente semejantes (0.407 y 0.400, respectivamente) y en el caso de la matriz de similitud para características morfológicas el promedio de similitud resultó ser el más alto (0.574). Es importante remarcar que, para este cálculo, sólo fueron consideradas las bandas que evidenciaron polimorfismos, 173

no incluyendo las monomórficas.

Resulta claro que los SSR poseen el mejor poder de resolución de la variabilidad y por lo tanto de discriminación entre las variedades analizadas. Los resultados se resumen en la **Tabla X**.

Tabla X: Promedio de similitud genética de las matrices de similitud, para cada tipo de marcador molecular y para los resultados obtenidos de la matriz de características morfológicas. Su respectiva varianza (Var), en el estudio de 100 variedades de soja con propiedad en la Argentina.

Matrices de Similitud	Promedio de similitud genética	Varianza (Var)
RAPD	0,40699712	0,016837
SSR	0,26192344	0,009120
AFLP	0,39743295	0,022823
Características Morfológicas	0,57388584	0,012411

Por otro lado, al comparar los promedios de similitud entre las matrices cofenéticas y su respectiva matriz de similitud para cada sistema (**Tabla X**), se buscó determinar qué cambios en los valores son responsables de producir distorsión. El promedio de similitud genética para cada matriz cofenética, resultó tener el mismo valor que el obtenido para las matrices de similitud que dieron origen a los dendrogramas (**Tabla X**). Pero el valor que cambió fue la varianza, lo que indica que las distorsiones se producen para los valores extremos de similitud (altos y bajos), manteniendo los valores promedios.

Los resultados se resumen en la **Tabla XI**.

Tabla XI: : Promedio de similitud genética de las matrices cofenéticas, para cada tipo de marcador molecular y para los resultados obtenidos de la matriz de características morfológicas. Su varianza (Var), en el estudio de 100 variedades de soja con propiedad en la Argentina.

Matrices de Similitud Cofenéticas	Promedio de índice de similitud genética	Varianza (Var)
RAPD	0,40699712	0,0065551
SSR	0,26192344	0,0044887
AFLP	0,39743295	0,0113892
Características Morfológicas	0,57388584	0,0055343

Los resultados obtenidos se resumen gráficamente en la **Figura 9** al comparar los histogramas de los valores de similitud de las matrices correspondientes a cada sistema utilizado.

Las características morfológicas evidencian una menor variabilidad entre las 100 variedades de soja, observándose un desplazamiento de la curva hacia la derecha (valores más altos de similitud). En contra posición a este resultado, los SSR muestran los valores de mayor variabilidad genética, con una curva desplazada hacia la izquierda (valores de menores de similitud) con respecto a los otros sistemas utilizados.

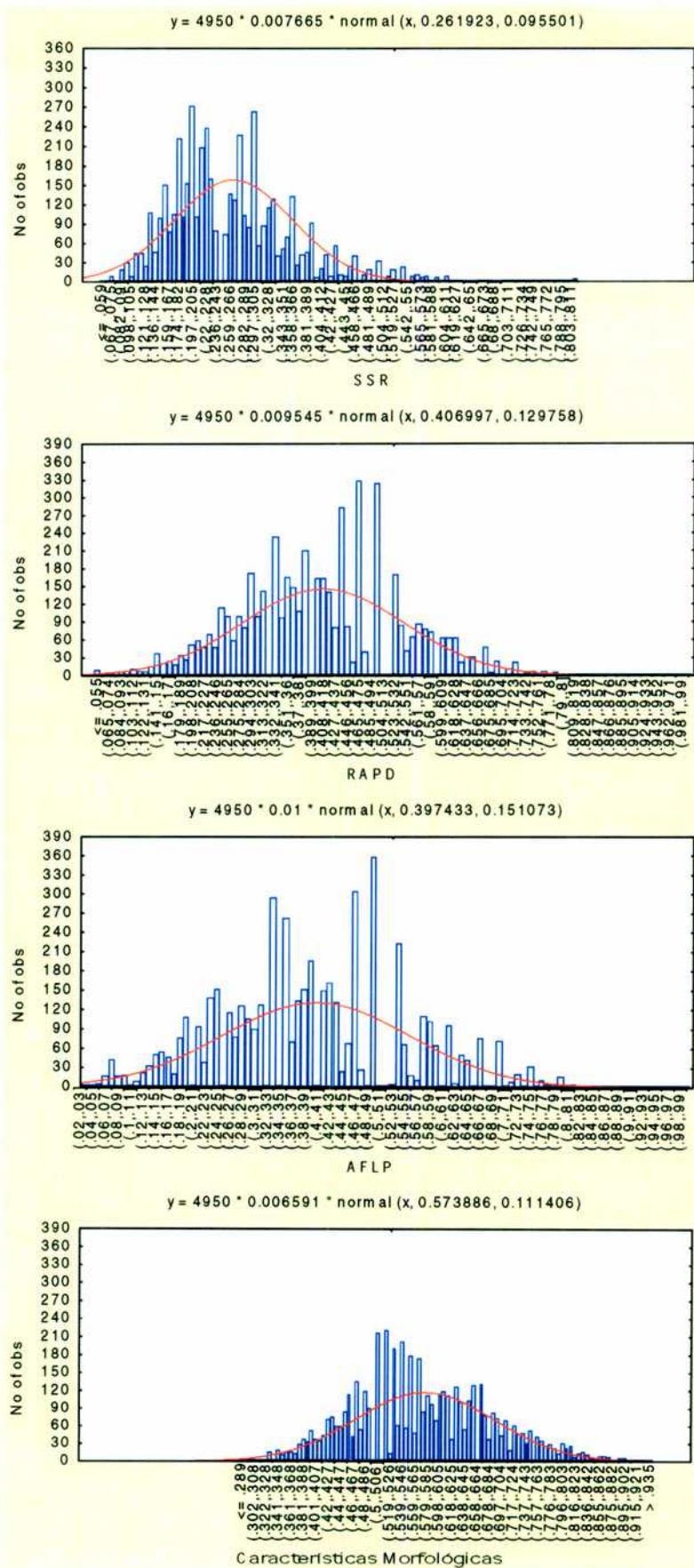


Fig. 9: Comparación de histogramas obtenidos de los valores de similitud de las matrices correspondientes a cada uno de los sistemas analizados (características morfológicas, SSR, RAPD y AFLP).

Luego de la construcción de las matrices de similitud, se calculó el coeficiente de correlación utilizando el “Test de correspondencia de matrices de Mantel” (Rohlf, F.J., 1992), lo que permite observar el grado de correlación o concordancia entre los distintos métodos.

Posteriormente, las matrices cofenéticas basadas en distintos tipos de marcadores moleculares y morfológicos se compararon entre sí, utilizando el mismo test de correspondencia.

Todos los coeficientes de correlación fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). El más alto entre las matrices de similitud se presentó entre SSR y RAPD ($r = 0.32914$), pero al comparar con los resultados de la matriz de similitud morfológica, el coeficiente de correlación más alto fue con los SSR ($r = 0.24687$) y el más bajo, entre AFLP y morfológico ($r = 0.11879$).

En general los coeficientes de correlación fueron relativamente bajos, lo que podría estar indicando que cada sistema analizado describe la “historia” evolutiva de las plantas de manera distinta. Los resultados se resumen en la **Tabla IX**.

Por otro lado, al observar el grado de distorsión presente entre cada matriz y su matriz cofenética, los coeficientes de correlación fueron altos, mostrando una baja distorsión.

Al comparar las matrices cofenéticas entre sí, los coeficientes de correlación fueron relativamente bajos. Los resultados se resumen en la **Tabla XII**.

Tabla XII: Coeficientes de correlación entre matrices de similitud (arriba de la diagonal) y matrices cofenéticas (debajo de la diagonal) obtenidas con distintos tipos de marcadores moleculares. Los valores de la diagonal indican el coeficiente de correlación entre la matriz de similitud y la matriz cofenética, para cada sistema estudiado.

	RAPD	SSR	AFLP	MORFOL.
RAPD	0.62396	0.32914	0.156917	0.15289
SSR	0.08374	0.70159	0.210945	0.24687
AFLP	0.18495	0.09147	0.706360	0.11879
MORFOL.	0.05678	0.15852	0.036260	0.66777

Los valores de similitud genética obtenidos de las matrices de similitud, se utilizaron para realizar una representación gráfica de las mismas por medio de dendrogramas.

En primer lugar se obtuvieron 4 dendrogramas, 3 de ellos correspondientes a los tres tipos de marcadores moleculares (RAPD, AFLP y SSR) y uno para las características morfológicas. Cada árbol derivado del análisis de los marcadores moleculares se comparó, individualmente, con el derivado del conjunto de características morfológicas, ya que éste es el único parámetro admitido legalmente hoy en día para evaluar las diferencias genéticas entre las variedades de soja.

Por otro lado, se intenta determinar cual de los marcadores utilizados mejora los resultados obtenidos a partir de las características morfológicas.

Se realizó la comparación de dos dendrogramas más, con el fin de observar si era posible obtener resultados aún más cercanos a los datos obtenidos de las características morfológicas y los de pedigrí.

Para ello se construyó una matriz básica de datos (MBD), sumando todos los datos moleculares obtenidos con las distintas técnicas (AFLP, RAPD y SSR) y se la comparó con el árbol de características morfológicas. Pero anteriormente, debido a la falta de congruencia existente en la posición de algunas variedades en cada sistema analizado, se realizó una purificación de dicha matriz, a la que denominamos Marcadores Moleculares Purificados (MMP).

Para ello se eliminaron aquellos marcadores que presentaban más de tres datos faltantes (codificados con el número 5) en la MBD, ya que las mismas producen distorsiones en la matriz y por ende en los dendrogramas (datos no mostrados).

Se realizaron los mismos análisis explicados con anterioridad. Los coeficientes de correlación fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). El coeficiente de correlación entre las matrices de similitud MMP y características morfológicas fue relativamente bajo ($r = 0.25691$).

Con respecto a la distorsión existente entre las matrices de correlación y las matrices cofenéticas, sus coeficientes de correlación muestran una baja distorsión entre las mismas. Los resultados se resumen en la **Tabla XIII**.

Tabla XIII: Coeficientes de correlación entre matrices de similitud (arriba de la diagonal) y matrices cofenéticas (debajo de la diagonal) obtenidas de los datos morfológicos vs marcadores moleculares purificada (MMP). Los valores de la diagonal indican el coeficiente de correlación entre la matriz de similitud y la matriz cofenética, para cada sistema estudiado.

	MORFOL.	MMP
MORFOL.	0.66777	0.25691
MMP	0.11546	0.66193

Para la comparación entre los árboles se realizaron los siguientes análisis: estudio del agrupamiento de acuerdo a su grupo de madurez, validación de las distancias genéticas por los datos de pedigrí y estudio de casos puntuales que permitan facilitar la visualización del ordenamiento genético del germoplasma de soja.

Para el primer caso, se considera que es una de las características más importantes. La soja es una especie de días cortos y la variación entre los grupos de madurez está dada fundamentalmente por los requerimientos de fotoperíodo de los cultivares. Se describió (Owen, 1927; Bernard, 1971; Buzzel y Voldeng, 1980), que existen cuatro genes involucrados en el tiempo de floración y maduración *E1*, *E2*, *E3* y *E4*. Su importancia radica en que variedades que pertenecen al grupo III, resultan ser bien distantes de las de grupo IX, de acuerdo a estudios realizados a campo, y aquellas pertenecientes a grupo VIII, estarían más relacionadas con las de grupo IX, que una variedad de grupo V y así sucesivamente relacionando todas las variedades entre grupo III a IX.

El segundo punto importante del análisis, es intentar validar los resultados y para ello se consideraron los pedigríes. Se seleccionaron las 6 variedades ancestrales más conocidas, “Essex”, “Hood”, “Forrest”, “Bragg”, “Williams” y “A3127” con el fin de realizar la comparación. Cada una es representada por distintos colores en los árboles.

3.2.1 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. RAPD

En la **Figura 10**, se observa que las estructuras de los árboles desde el punto de vista “macro”, resultan ser distintos, concordando con los datos obtenidos de los coeficientes de correlación entre ambas matrices de similitud (**Tabla XII**).

El árbol correspondiente a la técnica de RAPD se encuentra más desplazado hacia la izquierda que el árbol morfológico. Gráficamente se indica que los datos obtenidos sobre los promedios de similitud, determinan mayor variabilidad en los resultados obtenidos de RAPD que el observado de los datos morfológicos, (**Tabla X**).

De acuerdo a lo explicado, se observó que una de las características más importantes que se conserva dentro del dendrograma morfológico es el ordenamiento de acuerdo al grupo de maduración, existiendo algunas excepciones.

El dendrograma obtenido de los datos de RAPD se muestra relativamente con menor ordenamiento en cuanto al posicionamiento de las variedades que el morfológico, cuando se lo compara con los datos de pedigríes. Algunas variedades, como “A 3205” y “Tresur 321”, se encuentran fuera de su grupo en ambos árboles.

Las variedades pertenecientes al grupo IX de maduración, en el árbol de características morfológicas comparten un mismo cluster (“Fam241”, “MenINTA” y “FT11Alv”); en cambio en RAPD se encuentran dispersas en el árbol compartiendo su posición con variedades de los grupos V, VII y VIII.

Por lo tanto, al asociar las variedades de acuerdo a su pedigrí, hay un ordenamiento más coherente en los datos obtenidos en el dendrograma morfológico. Cada sector de colores indica las variedades que comparten un mismo pedigrí de salida. En conjunto el ordenamiento de las variedades, de acuerdo a su relación genética, se encuentra más coherente en el dendrograma morfológico. Un ejemplo de ello es que el grupo de variedades que comparten el ancestro “Essex” que se agrupan prácticamente en un mismo cluster, salvo algunas variedades como “Don Mario 55” que está asociada al cluster de su otro antecesor, indicando tal vez que en el programa de mejoramiento, su genoma se conservó más cercano a su otro ancestro. Lo mismo sucede al analizar los grupos de variedades provenientes de otros ancestros como ser, “Prata”, “A3127”, Williams”, “Forrest” y “Bragg”.

Un ejemplo puntual bien gráfico del grado de 182

desordenamiento que producen los RAPD, se observa en que las variedades “NS641”, “NS642”, “Granera 73” y “Ramson”, comparten un mismo ancestro y en el árbol morfológico se agrupan en un mismo subcluster, no siendo así en RAPD.

Con los marcadores RAPD no fue posible separar las variedades “A5308” y “OFPEC Santafesina”, conocidas por ser muy semejantes entre sí. Sólo con características morfológicas se logró separarlas con una distancia genética de 0.80, valor considerado como relativamente alto, es decir indicativo de una alta similitud.

Como conclusión de los resultados obtenidos, con los marcadores RAPD no fue posible lograr una mejoría de la medición de la relación genética entre variedades, en comparación con los descriptores morfológicos.

3.2.2 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. AFLP

En la **Figura 11**, se observa que las estructuras de los árboles desde el punto de vista “macro”, resultan ser distintas, concordando con los datos obtenidos de los coeficientes de correlación entre ambas matrices de similitud (**Tabla XII**).

El árbol correspondiente a la técnica de AFLP se encuentra más desplazado hacia la izquierda que el árbol morfológico. Gráficamente se indica que los datos obtenidos sobre los promedios de valores de similitud, determinan mayor variabilidad en los resultados obtenidos de AFLP que el observado de los datos morfológicos, (**Tabla X**).

Con respecto al ordenamiento de las variedades de acuerdo a su grupo de maduración, en el dendrograma obtenido de los datos de AFLP se vuelven a encontrar incorrectamente ordenadas las mismas variedades que ya se encontraron con los marcadores RAPD, como ser, “A 3205” y “Tresur 321” (ambas de grupo III). Aún más, aparece una variedad que se encontraba bien agrupada con variedades de grupo de maduración III (en el árbol de características morfológicas), pero, en AFLP, se desordena. Es el caso de “Caminera 32” (grupo de maduración III).

Las variedades pertenecientes al grupo IX de maduración, en el árbol de características morfológicas comparten un mismo cluster (“Fam241”, “MenINTA” y “FT11Alv”) y con AFLP han logrado agruparse de la misma manera. Se forma un núcleo entre las variedades “Fam240” y “MenINTA”, que a su vez se unen a la variedad “FT11Alv”.

Asociando las variedades de acuerdo a su pedigrí, hay un ordenamiento más coherente en los datos obtenidos en el dendrograma morfológico.

Como se especificó anteriormente los colores indican las variedades que comparten un mismo pedigrí de salida. En su conjunto el ordenamiento de las variedades de acuerdo a su relación genética, se encuentra más coherentemente representado en el dendrograma morfológico. Es más, se observa aún mayor desorden en el dendrograma de AFLP, que el presentado por los RAPD. Gráficamente se observa que dichos colores se distribuyen a lo largo de todo el dendrograma y no parece que tiendan a agruparse de acuerdo a su cercanía genética por el hecho de compartir ancestros. Un ejemplo del mayor desorden se puede observar en el caso de las variedades “ACA681” y “ACA731”. Ambas comparten los mismos ancestros, con la diferencia que la primera de ellas pertenece al grupo de maduración VI y la segunda al grupo de maduración VII.

En el dendrograma de características morfológicas se encuentran formando parte de un mismo núcleo, en cambio en el caso de los AFLP, se encuentran bien distantes una de la otra, pues ambas pertenecen a clusters completamente diferentes y el punto de enlace (distancia genética) entre las mismas que las incluyen, es de 0.40. Lo mismo sucede al analizar los grupos de variedades provenientes de otros ancestros como ser, “Prata”, “A3127”, Williams”, “Forrest” y “Bragg”.

Concordando con lo que ocurre para RAPD, se observó que las variedades “NS641”, “NS642”, “Granera 73” y “Ramson”, comparten un mismo ancestro, en el árbol morfológico se agrupan en un mismo subcluster, no siendo así en AFLP. Más aún, se agrupan más distanciadas entre sí que en el dendrograma de RAPD.

Con los marcadores AFLP no fue posible separar las variedades “Torcaza58” y “A7894”, cuyos pedigríes son, aparentemente, distintos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no fue posible lograr una mejoría de la medición de la distancia genética entre variedades con los marcadores AFLP con respecto a las características morfológicas, ni aún con respecto a los marcadores RAPD.

3.2.3 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. SSR

En la **Figura 12**, se observa que las estructuras de los árboles desde el punto de vista “macro”, resultan ser distintos, concordando con los datos obtenidos del coeficiente de correlación entre ambas matrices de similitud (**Tabla XII**).

El árbol correspondiente a la técnica de SSR se encuentra mucho más desplazado hacia la izquierda que el árbol morfológico. Gráficamente se indica que, como era esperable, cuando se comparan datos promedios similitud, se evidencia una mayor variabilidad genética en los resultados obtenidos por la técnica de SSR, que con los resultados de origen morfológico (**Tabla X**).

Con respecto al ordenamiento de las variedades de acuerdo a su grupo de maduración, en el dendrograma obtenido de los datos de SSR se encuentra que la variedad “A 3205” (variedad de grupo III) se agrupa en el cluster correspondiente al de los de grupo III y IV, en cambio la variedad “Tresur 321” (variedad de grupo III), aún sigue desordenada con respecto a su grupo de maduración, mostrando el mismo comportamiento que el árbol de características morfológicas.

Las variedades pertenecientes al grupo IX de maduración, en el árbol de características morfológicas comparten un mismo cluster (“Fam241”, “MenINTA” y “FT11Alv”) y con SSR han logrado agruparse de la misma manera. Se forma un núcleo entre las variedades “Fam240” y “MenINTA”, que a su vez se unen a la variedad “FT11Alv”, de la misma manera que con los datos morfológicos.

El dato más importante es que, asociando las variedades de acuerdo a su pedigrí, hay un ordenamiento mucho más coherente con el dendrograma generado con datos de marcadores SSR que con el generado con los datos morfológicos.

Si se observa en forma general la distribución de los colores (símbolos de pedigrí) en el árbol de SSR, las variedades se presentan prácticamente en su totalidad agrupadas de acuerdo a sus ancestros de partida.

En forma general existen variedades que, no forman parte del grupo de sus ancestros, pero sí lo forman con el grupo de su otro ancestro, determinando que en los programas de mejoramiento se conservó o seleccionó más la información genómica de un ancestro con respecto al otro (típico de un proceso de retrocruza, por ejemplo).

Un ejemplo de ello se ve, analizando el grupo de variedades que derivan de “Essex”. Existen dos grandes grupos, aquellos que derivan de “Essex” y un segundo que se agrupa con los de pedigrí “Williams”, demostrando que se unen más al grupo de su otro ancestro.

Es el caso de “Tijereta 42”, que si bien tiene como ancestro a “Essex” queda en el mismo cluster que “Williams”, su otro ancestro. Otro caso sería el de “ACA681” y “ACA731”, ambos tienen igual pedigrí, pero en el árbol de SSR, “ACA681” se agrupa con las variedades derivadas de “Bragg” y “ACA731” se agrupa con las variedades derivadas de “Prata”. Este caso es importante de resaltar, ya que si bien tienen igual pedigrí de salida, la presión de selección y el criterio de selección dado por los mejoradores fue distinto. Lo mencionado logró evidenciarse solamente con los resultados de SSR, ya que con los datos de las características morfológicas no fue posible determinarlo (ambas variedades se agrupan en un mismo núcleo).

Es importante resaltar que las características morfológicas tienen incorporadas un importante componente genético derivado del proceso de selección, ya que el mejoramiento genético se basa en los criterios agronómicos y luego se fija su información genética para encontrar diferencias morfológicas.

Con lo que se puede concluir que, si bien las características morfológicas fueron (y siguen siendo) utilizadas para la diferenciación, los SSR logran explicar mucho mejor la evolución genómica de las variedades, ya que la forma de relación de datos es la más congruente con los datos de pedigrí.

Lo mismo sucede al analizar los grupos de variedades provenientes de otros ancestros como ser, “Prata”, “A3127”, “Williams”, “Forrest” y “Bragg”.

De acuerdo a los resultados se logró tener mayor información genética con los SSR, mejorando los resultados obtenidos en el dendrograma de características morfológicas.

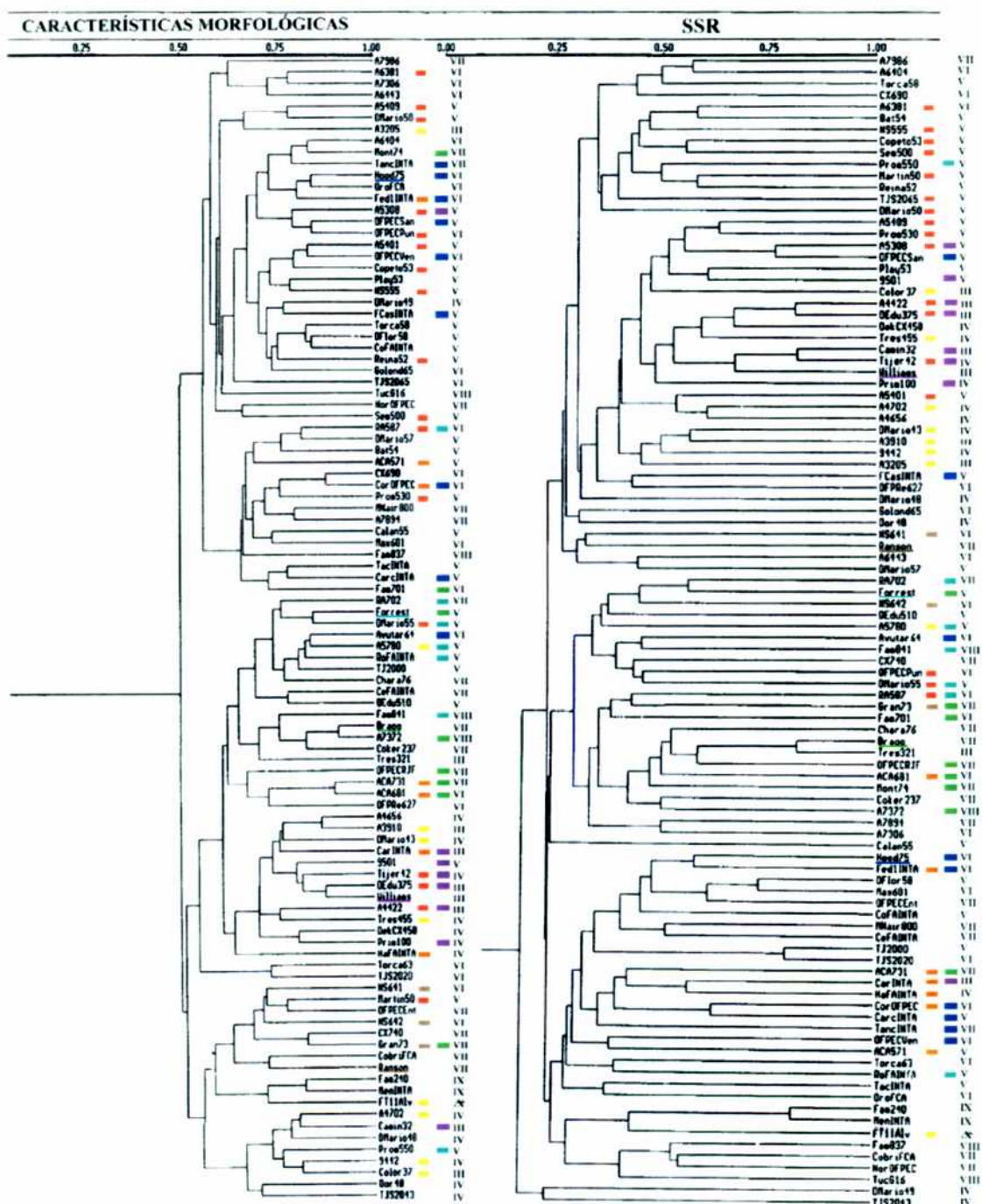


Fig.12: Dendrogramas de 100 variedades de soja, obtenidos de datos de características morfológicas vs. SSR. Los colores representan los pedigríes (“Hood 75”, “Forrest”, “Bragg”, “Williams”, “Ramson” y “Prata”). Los números romanos indican los grupos de maduración de cada una de las 100 variedades analizadas.

3.2.4 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. marcadores moleculares purificados (MMP).

Con el fin de determinar si la combinación de datos de diferentes marcadores moleculares arrojaba resultados aún más cercanos a los datos de pedigrí, se construyó una MBD sumando los datos moleculares obtenidos con las distintas técnicas (AFLP, RAPD y SSR).

Debido a la falta de congruencia existente en la posición de algunas variedades en los dendrogramas de cada uno de los marcadores moleculares, se realizó una purificación de las matrices.

Se volvió a la MBD para cada marcador y se eliminaron aquellos marcadores que presentaban más de tres datos faltantes (codificados con el número 5), ya que el programa NTSYS-PC a pesar de no tener un valor exacto (1= presencia/0 = ausencia), los relaciona produciendo distorsiones en la matriz y por ende en los dendrogramas (datos no mostrados).

Un total de 22 marcadores RAPD y AFLP fueron eliminados, conservándose la totalidad de los SSR, ya que ninguno de los mismos superó el límite de tres datos faltantes. De esta manera se obtuvo un nuevo dendrograma al que llamamos dendrograma de MMP (Marcadores Moleculares Purificados).

En la **Figura 13**, se observa que las estructuras de los árboles desde el punto de vista “macro”, resultan ser distintos, el dendrograma de MMP se encuentra mucho más desplazado hacia la izquierda que el árbol de características morfológicas, evidenciando así mayor variabilidad que los datos morfológicos.

Con respecto al ordenamiento de las variedades de acuerdo a su grupo de maduración, en el dendrograma MMP se encuentra que la variedad “A 3205” (variedad de grupo III) se logra agrupar en el cluster correspondiente al de los de grupo III y IV, en cambio con respecto a la variedad “Tresur 321” (variedad de grupo III), aún sigue desordenada con respecto a los de su grupo, es decir, con igual comportamiento que en el árbol de SSR.

Las variedades pertenecientes al grupo IX de maduración, en el árbol de características morfológicas comparten un mismo cluster (“Fam241”, “MenINTA” y “FT11Alv”) y en el árbol de MMP han logrado agruparse de la misma manera.

Se forma así un núcleo entre las variedades “Fam240” y “MenendeINTA”, que a su vez se unen a la variedad “FT11Alv”.

Asociando las variedades de acuerdo a su pedigrí, hay un ordenamiento más coherente con los datos obtenidos en el dendrograma de MMP, con respecto al de características morfológicas.

Si se observa en forma general la distribución de los colores (símbolos de pedigrí) en el árbol de MMP, se presentan grupos de variedades de acuerdo a sus ancestros de partida más que en morfológicos. Pero, si volvemos a la **Figura 12**, se encuentra más ordenado el dendrograma de SSR que el de los MMP.

Existen algunas variedades que de acuerdo a los datos genealógicos, se agrupan cercanos sólo a uno de sus ancestros. Un ejemplo de ello se observa analizando el grupo de variedades que derivan de “Bragg”. Existe un gran grupo variedades para el cual uno de sus ancestros es “Bragg” incluyendo a la variedad “ACA 731” que también deriva de “Bragg”. Sin embargo, “ACA731” se encuentra más asociada a su otro ancestro, “Prata”.

Un caso interesante es el de “ACA681” y “ACA731”, ambos tienen igual pedigrí, pero en el árbol de MMP, “ACA681” se agrupa con las variedades derivadas de “Bragg” y “ACA731” se agrupa con las variedades derivadas de “Prata”. Para el caso del dendrograma de características morfológicas, ambas se agrupan en un mismo núcleo.

Prácticamente los resultados son semejantes a los obtenidos con los SSR.

Lo mismo sucede al analizar los grupos de variedades provenientes de otros ancestros como ser, “Prata”, “A3127”, “Williams”, “Forrest” y “Bragg”.

De acuerdo a los resultados se logró tener mayor información con los MMP, conservando y mejorando los resultados obtenidos en el dendrograma de características morfológicas, pero no se encontraron grandes diferencias con el dendrograma de SSR.

Se han observado algunos casos de desorden en el árbol de MMP con respecto a SSR. Un ejemplo de ello sería, que en el dendrograma de MMP, las variedades que derivan de “Essex”, se encuentran distribuidas a lo largo del árbol no permitiendo agruparse en un mismo cluster como sucede en el caso de los SSR.

En forma general los SSR y MMP, han logrado obtener mayor información que las características morfológicas por sí mismas. Por otro lado los SSR mostraron, de acuerdo a los resultados, dar la máxima información.

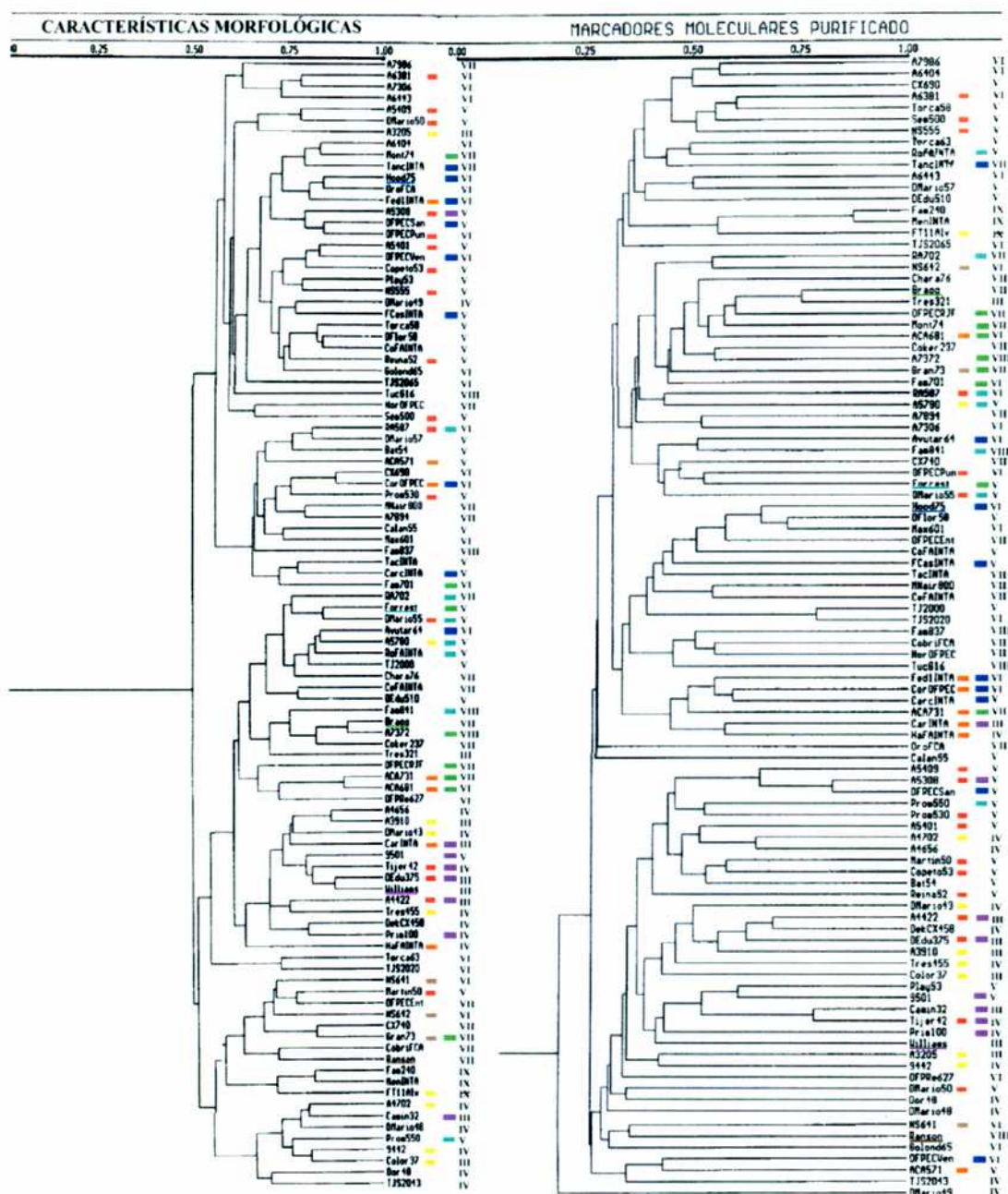


Fig.13: Dendrogramas de 100 variedades de soja, obtenidos de datos de características morfológicas vs. MMP. Los colores representan los pedigríes (“Hood 75”, “Forrest”, “Bragg”, “Williams”, “Ramson” y “Prata”). Los números romanos indican los grupos de maduración de cada una de las 100 variedades analizadas.

3.2.5 Comparación de los dendrogramas de características morfológicas vs. características morfológicas + SSR

De acuerdo a lo estudiado en el punto anterior, se observó que los resultados obtenidos de SSR y los del conjunto de los marcadores moleculares purificados (MMP) fueron prácticamente similares, aunque se encontró mayor coherencia, de acuerdo a los pedigríes y grupos de maduración, con los SSR.

En la siguiente combinación, se decidió juntar todos los datos de características morfológicas con los de SSR, ya que aparentemente por lo observado anteriormente, cada tipo de estudio estaría otorgando información distinta. Para el primer caso, el ordenamiento entre las variedades se realiza de acuerdo a las características que se utilizan para su diferenciación y los caracteres agronómicos seleccionados por los mejoradores. En cambio, los SSR reflejan mejor la evolución y conservación del genoma permitiendo agrupar a la mayoría de las variedades de acuerdo a su pedigrí.

En otras palabras, la combinación de datos constituye un intento de clasificar todas las líneas disponibles tomando en cuenta tanto su similitud genética (datos SSR), como los genes de importancia diferencial (datos morfológicos) integrando así toda la información recolectada.

La hipótesis de trabajo se propone demostrar que al combinar ambas categorías de información se podría llegar a estimar la distancia genética mínima que permite diferenciar entre dos variedades de soja, en el contexto de las 100 variedades estudiadas.

En la **Figura 14**, se muestra la comparación de los dendrogramas de la suma de datos de Características morfológicas + SSR vs. Características morfológicas solamente.

Las estructuras de los árboles, desde el punto de vista “macro”, resultan ser distintas. El árbol correspondiente a la suma de datos morfológicos y SSR se encuentra mucho más desplazado hacia la izquierda, demostrando la mayor influencia de los datos de SSR al ser sumados a los morfológicos, cuyo promedio de similitud es más alto.

Se calculó el coeficiente de correlación entre ambas matrices (Características morfológicas + SSR vs. Características morfológicas), el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). El coeficiente de correlación fue alto ($r = 0.674638$), lo cual puede ser atribuido, probablemente, a la superposición de datos en ambos dendrogramas (información redundante).

Con respecto al ordenamiento de las variedades de acuerdo a su grupo de maduración, se observa que la variedad “A 3205” (variedad de grupo III) se logra agrupar en el cluster correspondiente al de los de grupo III y IV.

En cambio la variedad “Tresur 321” (variedad de grupo III), aún sigue desordenada con respecto a los de su grupo, reflejando el comportamiento del árbol de características morfológicas y del de marcadores por separado. Una explicación que se podría dar a este caso particular es que, posiblemente, su ubicación sea la correspondiente y que no podamos visualizarla, porque no se tiene el dato correcto de pedigrí de esta variedad, ya sea por un error en los cruzamientos a campo o por la codificación intencional de uno de sus ancestros (hay ejemplos documentados de ambas posibilidades).

Las variedades pertenecientes al grupo IX de maduración (“Fam241”, “MenINTA” y “FT11Alv”) han logrado agruparse en un mismo “cluster”, mostrando una distancia genética mayor con respecto al resto de las demás variedades.

Estos datos confirman que las variedades de grupo de maduración IX, estarían genéticamente más alejadas que el resto de las variedades cuyos grupos de maduración están entre III y VIII.

Asociando las variedades de acuerdo a su pedigrí, hay un ordenamiento muy coherente con los datos obtenidos de características morfológicas + SSR, con respecto a características morfológicas solamente.

Si se observa en forma general la distribución de los colores (símbolos de pedigrí), en el árbol de características morfológicas + SSR, se presentan las variedades, casi en su totalidad, agrupadas de acuerdo a sus ancestros de partida. Pero en aquellos casos donde la variedad no forma parte del grupo de uno de sus ancestros, sí se agrupa al cluster de su otro ancestro debido a que, como ya se comentó anteriormente, es una selección de tipo recurrente hacia uno de sus ancestros

Un caso interesante que se evidenció al comparar todos los dendrogramas es el de “ACA681” y “ACA731”, ambos tienen igual pedigrí. En el árbol de datos morfológicos, ambas variedades pertenecen a un mismo núcleo con una distancia genética de 0.90, cuando se estudió el árbol de SSR, “ACA681” se agrupa con las variedades derivadas de uno de sus ancestros y “ACA731” se agrupa con las variedades derivadas de su otro ancestro.

Al observar el dendrograma de características morfológicas + SSR, las variedades volvieron a agruparse en un mismo núcleo con una distancia genética entre ellas de 0.55. Indudablemente los datos de las características morfológicas se han potenciado respecto a los datos obtenidos de los SSR. A pesar que las variedades son tan semejantes entre sí desde el punto de vista fenotípico, los datos de SSR han logrado aumentar las distancias genéticas de 0.90 a 0.55. Sin embargo esto no fue suficiente como para separarlas de acuerdo a su pedigrí, como sí se obtuvo con los SSR solamente.

Se puede concluir que, si bien las características morfológicas han y siguen siendo privilegiadas para la diferenciación, los datos que ambos sistemas nos brindan resultan ser relativamente distintos y complementarios. Los SSR han logrado explicar mejor la composición genética global de las variedades, ya que la forma en que relacionan a las mismas, concuerda más con los datos de pedigrí. En cambio, las características morfológicas explican más en base al sistema de diferenciación estipulado que a la relación genealógica.

La menor distancia genética entre dos variedades, fue la encontrada entre “A5308” - “OFPECSant” y “Famaillá 240” - “Menende INTA”, cuyo valor de distancia genética resultó ser de 0.80 y 0.85 respectivamente, en ambos dendrogramas comparados.

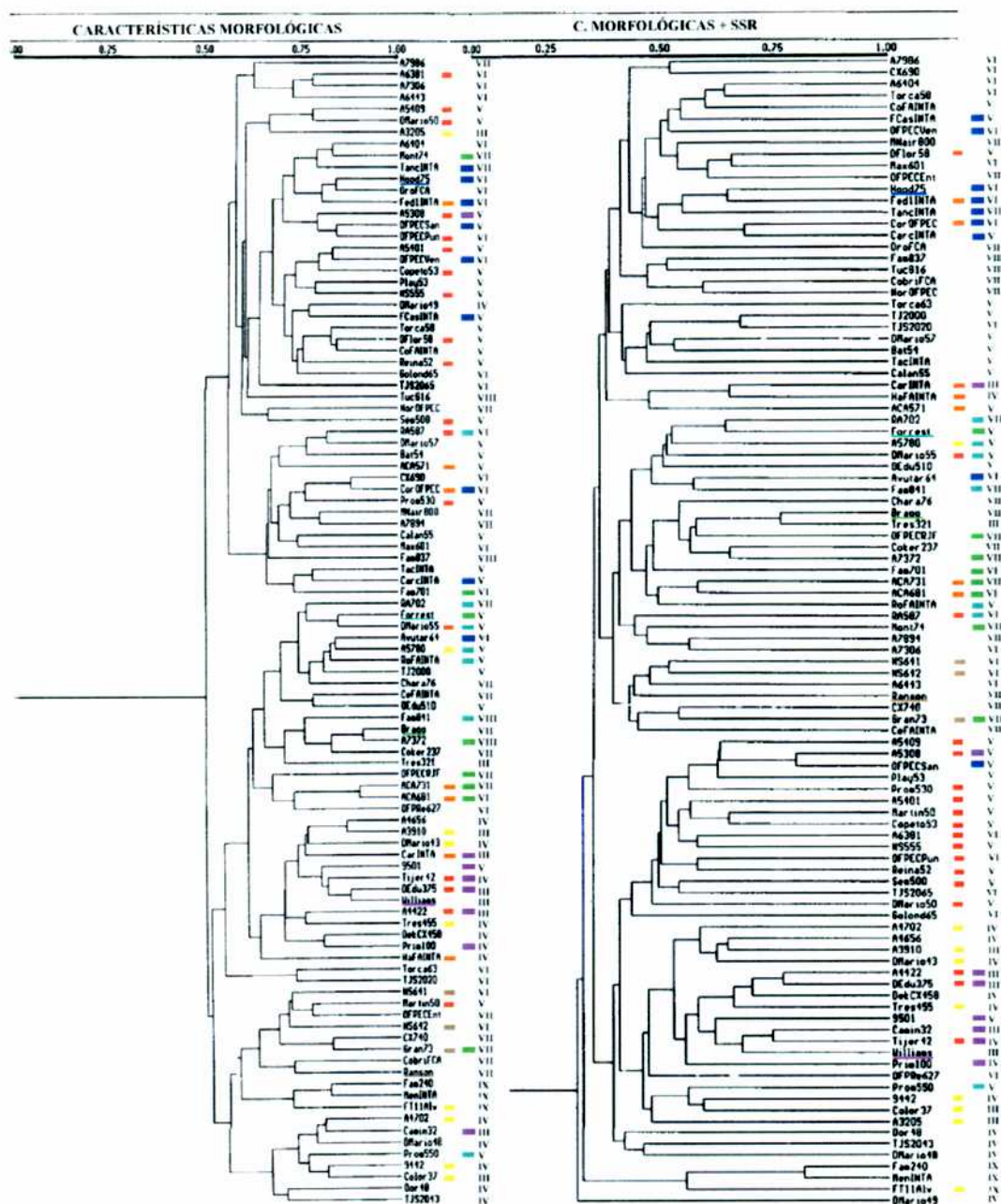


Fig. 14: Dendrogramas de 100 variedades de soja, obtenidos de datos de características morfológicas vs. características morfológicas + SSR. Los colores representan los pedigrís (“Hood 75”, “Forrest”, “Bragg”, “Williams”, “Ramson” y “Prata”). Los números romanos indican los grupos de maduración de cada una de las 100 variedades analizadas.

DISCUSSION

1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Con el fin de obtener “la huella digital fenotípica” de las variedades por medio de los datos recolectados de las características morfológicas, se inició el trabajo analizando las 4 características recomendadas por UPOV. No fue posible separar todas las variedades de soja por este criterio.

Posteriormente al aumentar el número de características a 8, tampoco fue posible la separación de las 100 variedades.

Como uno de los objetivos de este trabajo es comparar la capacidad, ventajas y desventajas de marcadores morfológicos y moleculares para la caracterización y diferenciación genotípica, se agregaron más características hasta lograr separar las 100 variedades de soja. Al realizar entonces, el análisis de las 16 características morfológicas, recién se logró la separación de las variedades.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no existió una gran correlación entre las matrices de datos resultantes del análisis de polimorfismos generados por distintos tipos de marcadores sean éstos morfológicos o moleculares (AFLP, RAPD y SSR) ya que los coeficientes de correlación resultaron ser relativamente bajos, indicando que las informaciones que se obtienen de cada sistema resultan ser distintas.

En otras palabras, no hay una clara correlación entre la expresión morfológica y la molecular e incluso entre distintas variantes de marcadores moleculares. Indicando, que cada sistema por sí mismo, estaría explicando la “historia evolutiva de las plantas” de manera distinta.

Lo más interesante se observó cuando se realizó la agrupación de las variedades de acuerdo a sus relaciones genéticas por los datos suministrados por características morfológicas (dendrograma). Las mismas se agruparon fundamentalmente respetando su grupo de maduración y sus posiciones no fueron coherentes con la información suministrada por la genealogía (pedigrí) de cada una de las variedades.

Se podría decir entonces que las características morfológicas sólo reflejan el sistema creado para la diferenciación, pero no reflejan (ni explican) el proceso de selección (evolución del genoma) realizado por los mejoradores, basado en criterios agronómicos.

Se espera que las diferencias morfológicas necesarias para el Registro y Verificación, solicitada por las Instituciones Oficiales, sean suficientes para su Registración. Por lo tanto resulta claro que las características morfológicas, se basan en describir el genoma a través del fenotipo, de una manera codificada, siguiendo los métodos y

escalas establecidas por las directrices DHE.

Estos datos son congruentes con el concepto de que las características morfológicas utilizadas para la diferenciación e identificación, no están seleccionadas de acuerdo a la cobertura de la variabilidad en el genoma, ni tampoco tienen la función de explicar las distancias genéticas entre las variedades, **sólo buscan lograr la diferenciación de una variedad nueva, con respecto a las ya existentes.**

Por otro lado, los valores de similitud entre las variedades derivados del análisis de caracteres fenotípicos fueron los más altos (0.50 – 0.90) entre todos los sistemas estudiados, reflejando una baja cobertura de la variabilidad genética (en número de *loci* genómicos polimórficos representativos).

Fundamentalmente las características morfológicas, fueron comparadas con los marcadores moleculares debido que en la actualidad constituyen el sistema que se utiliza para diferenciar e identificar variedades (al igual que en la taxonomía no numérica para los agrupamientos sistemáticos). Se utilizaron las características morfológicas, para comparar los resultados moleculares ya que es el único sistema que tenemos para explicar hoy la “realidad” de las variedades cultivadas. Por estas razones, los organismos como UPOV están cada vez más interesados en el desarrollo de las técnicas moleculares y sus aplicaciones en la descripción de variedades.

En la actualidad la caracterización por características morfológicas no puede ser reemplazada por técnicas moleculares. Se considera que el resultado de estudios moleculares y/o bioquímicos pueden ser un complemento a la caracterización. Una de las razones es que en la definición de “variedad” está claramente indicado que la distinción entre variedades debe establecerse mediante la expresión de caracteres resultantes del genotipo. A menos que el descriptor molecular sea un marcador para un carácter fenotípico, no hay forma de saber si el descriptor molecular se refiere a una parte del genoma que se expresa o no. Una solución podría ser no modificar la definición de variedad que es acorde con el enfoque del obtentor (la selección se realiza sobre el fenotipo para mejorar las características agronómicas o tecnológicas), sino desarrollar un nuevo enfoque a la distinción basándose en distancias genéticas (UPOV/QUI/96/13).

2. COMPARACIÓN DE TODOS LOS SISTEMAS UTILIZADOS (CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, SSR, RAPD, AFLP Y SUS COMBINACIONES)

En nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo realizado para la comparación de tres tipos de marcadores moleculares (RAPD, AFLP y SSR) juntamente con características morfológicas utilizadas en la diferenciación y caracterización de variedades cultivadas de soja (*Glycine max.* (L) Merr.), sobre 100 variedades inscriptas en un Instituto Oficial (INASE) de gran interés comercial en nuestro país.

Más aún, se trabajó con el conocimiento parcial de los pedigríes de las mismas, con el fin de validar y comprender el alcance que cada uno de los sistemas podían demostrar.

Previos estudios han considerado la utilidad de distintos marcadores moleculares, para la obtención de “la huella digital genética” de cultivares. En la caracterización de 12 variedades de algodón (Multani *et al.* , 1995), utilizaron 30 marcadores RAPD, de los cuales obtuvieron 453 marcadores y sólo el 15.2%, presentaron polimorfismo.

Demuestran en su trabajo, que es posible diferenciar variedades altamente relacionadas con marcadores moleculares. Por otro lado, confirmaron que sus resultados obtenidos, al ser validados con datos de pedigrí mostraban una agrupación coherente entre las mismas. Si bien las especies analizadas son distintas a las de esta tesis, los resultados concuerdan con nuestro trabajo. Es claro que los marcadores moleculares, brindan la posibilidad de explicar mejor la “historia evolutiva” de las plantas.

Usando como base de 10 variedades de colza, Lee *et al.* (1996), demostraron la utilidad de los marcadores RAPD para la identificación. Obtuvieron para cada una de las variedades un patrón único, pero se hace énfasis en los problemas de la reproducibilidad que presenta la técnica. Concordantemente con estos resultados, también se ha logrado, prácticamente, caracterizar todas las variedades de soja con 31 marcadores RAPD, pero el problema de la reproducibilidad de la técnica es una realidad. Al querer repetir, por ejemplo, los ensayos en termocicladores distintos ya sea en el mismo laboratorio o en laboratorios distintos, los patrones no resultaron ser idénticos.

Con respecto a la utilización de marcadores AFLP, Vos *et al.* (1995), demostraron su capacidad multiplex (detección de varios marcadores en un mismo gel) analizando diferentes especies cuyos

tamaños de ADN varían (tomate, Arabidopsis, maíz, avena, lechuga, colza y ADN humano).

Demostraron que esta técnica provee un amplio camino en la amplificación simultánea de fragmentos largos, que el número de fragmentos aumenta con el tamaño del genoma y que los nucleótidos selectivos al final del “primer” reducen el número de bandas. Concluyen que con pocas combinaciones de “primers”, es posible obtener la “huella digital genómica” de individuos altamente relacionados. En soja con la utilización de 5 combinaciones de “primers” logramos separar prácticamente todas las variedades, concordando con el trabajo anterior que es la técnica con mayor capacidad multiplex. Sin embargo, no se observaron (con las combinaciones utilizadas), altos valores de índices de contenido polimórfico (PIC), no pudiendo obtener información suficiente para encontrar resultados más coherentes con respecto al agrupamiento de las variedades según datos de grupos de madurez y pedigríes.

Sobre la obtención de “la huella digital genómica” de 47 variedades de soja (*Glycine max.*), se estudió la capacidad que tenían distintos “motivos” (CT, GAA, AAGG, AAT, ATT) de evidenciar patrones polimórficos entre las variedades. Yanagisawa *et al.* (1994), determinaron que la organización y abundancia de específicos “motivos” específicos de microsatélites, variaba entre plantas de distintas especies. La detección del “motivo” más adecuado para la especie en cuestión, es esencial para la obtención de una “huella

digital genómica”.

Por análisis previos (Hayashi *et al.* , 1993), sabían que el “motivo” (AAT)_n era abundante en el genoma de soja.

Observaron que los 47 cultivares podían ser identificados con la utilización del “motivo” (AAT)_n, pero no así con los anteriormente mencionados. Los “motivos” (AT)_n y (ATT)_n, fueron previamente identificados en el genoma de soja (Akkaya *et al.* , 1992; Morgante y Olivieri, 1993).

Nuestros resultados muestran que los motivos (ATT)_n, no sólo son altamente abundantes en el genoma de soja, sino que presentan alta información polimórfica.

Posiblemente la hipervariabilidad de los “motivos” (ATT)_n, (AAT)_n, esté dada por el sistema de “deslizamiento-slippage” de la ADN polimerasa, conocido por ser potencialmente dependiente del contenido de secuencias AT involucradas (Schlötterer y Tautz, 1992).

Tal es así que dichos “motivos” serían susceptibles de provocar mayor error en la replicación y producir una frecuencia de mutación mayor que otros “motivos”.

Morgante y Olivieri (1993), estimaron que los microsatélites de “motivos” (AT)_n, (TA)_n, (ATT)_n, (AAT)_n, (TAT)_n, etc. (di y tri-nucleótidos) tienen una frecuencia de aparición en el genoma de soja de hasta 50 kb. Por lo tanto, al seleccionar en nuestro estudio microsatélites con “motivos” (ATT)_n, se aseguraba la posibilidad

de espaciamiento de los mismos en el genoma con el fin de obtener un adecuado muestreo. Posteriormente, nuestra hipótesis fue verificada con el mapa de marcadores SSR publicado en julio de 1998.

La hipervariabilidad de los marcadores de ADN, tales como los microsatélites, contribuyen al desarrollo de mapas genéticos de diferentes especies (Beckmann y Soller, 1990). Hemos observado que los marcadores SSR pueden ser además, rutinariamente utilizados para propósitos de obtención de “huellas digitales genómicas” y más aún para la diferenciación de variedades nuevas a ser inscriptas en los Registros Oficiales de Cultivares.

Maughan *et al.* ,(1995), estudiaron la capacidad de variabilidad genética de 5 *loci* SSR en 62 individuos de soja cultivada (*Glycine max.*) y 32 individuos de soja silvestre (*Glycine soja*). Encontraron que el número de alelos totales de los 5 marcadores SSR, tanto en soja cultivada como silvestre fue entre 2-21 alelos. Pero determinaron que la soja silvestre (*G. soja*) es más variable que la soja cultivada (*G. max.*), ya que en el primer caso el número de alelos encontrados fue entre 5-21 y para la soja cultivada fue entre 2-8. Por otro lado observaron que el valor promedio de índices de contenido polimórfico (PIC) para la soja cultivada como para la soja silvestre fue 0.55 y 0.87, respectivamente. Demostrando así, la cercanía genética existente entre los individuos de soja cultivada. Nuestros resultados han concordado con los datos obtenidos de este trabajo ya que el

número de alelos encontrados en variedades de soja (*G. max.*) también fue entre 2-8 y con respecto al índice de contenido polimórfico (PIC), nuestro valor fue aún superior 0,601, demostrando que el tipo de *loci* seleccionados para nuestro trabajo brindan mayor información polimórfica.

El análisis de 96 individuos de soja, de los cuales 60 son ancestros de la soja cultivada (*G. max.*), 23 introducciones de plantas cultivadas (*G. max.*), 5 introducciones de plantas silvestres (*G. soja*) y 8 plantas silvestres (*G. soja*) representantes de China, ha permitido la identificación genotípica, utilizando 7 marcadores SSR, di y tri-nucleótidos, (AT)_n y (ATT)_n (Rongwen *et al.*, 1995). De los 7 *loci* SSR, 4 concuerdan con los estudiados en nuestro trabajo (SATT-001; SATT-002; SATT-005; SATT-009). Sobre el análisis del índice de contenido polimórfico (PIC) de los 96 genotipos analizados con estos 4 marcadores SSR, obtuvieron un promedio de 0.81, valor más elevado que el obtenido por nosotros con los mismos marcadores SSR (0.56), en un total de 100 variedades cultivadas. Una explicación a ello se debe, que han trabajado mezclando plantas cultivadas como silvestres y según los resultados de trabajos mencionados con anterioridad, existe mayor variabilidad entre las plantas silvestres que entre las cultivadas. Por lo tanto, al sumar los resultados (plantas silvestres más plantas cultivadas) se estaría elevando el valor del PIC. Pero si consideramos del trabajo sólo el resultado obtenido de 60 plantas cultivadas (dentro de los 96 genotipos que se analizaron)

con los 4 marcadores SSR, se obtiene un PIC de 0.67, prácticamente semejante al obtenido en nuestro trabajo también considerando sólo los 4 marcadores SSR (mencionados anteriormente), cuyo valor fue 0.56.

La diferencia radica en que, nuestro trabajo, se analizaron un total de 100 variedades, pudiendo ser una explicación posible a la diferencia de los índices de contenido polimórfica (PICs). Como conclusión, estos autores consideran que utilizando 15 microsatélites, se podría lograr la “huella digital genómica” de 96 variedades cultivadas. En cambio, en nuestro trabajo, después de haber seleccionado los 15 marcadores SSR de mayor información polimórfica, sólo el 80% de las 100 variedades de soja analizadas pudieron ser identificadas. Por lo tanto, consideramos que 15 *loci* SSR no son suficientes para lograr caracterizar y más aún diferenciar variedades cultivadas altamente relacionadas, sólo lo hemos logrado a partir del estudio de 27 marcadores SSR, con mayor información polimórfica.

Se realizó la comparación de tres sistemas moleculares (RAPD, AFLP y SSR) en el análisis de 16 cultivares de papa, con el fin de obtener la relación genética entre las mismas (Milbourne *et al.*, 1997). Observaron que los tres sistemas tenían la capacidad de discriminar las 16 variedades utilizando el mínimo de ensayos, 5 combinaciones de “primers” AFLP, 14 “primers” RAPD y 17 *loci* SSR. La técnica que mostró mayor capacidad multiplex fue AFLP y la de mayor

índice de contenido polimórfico (PIC) los SSR. Los coeficientes de correlación obtenidos entre las distintas matrices de similitud, mostraron ser relativamente bajos.

Semejantes resultados son los que se obtuvieron en nuestro trabajo, con respecto a la capacidad multiplex de la técnica de AFLP y la capacidad que presentan los marcadores SSR en brindar la máxima información polimórfica (concordando con trabajos anteriormente mencionados). La diferencia es que pudimos trabajar con la mayoría de los datos de pedigrí, permitiendo validar nuestros resultados y detectar cual de las tecnologías podían acercarse más a la “realidad”, explicando el proceso evolutivo de cada cultivar.

Al comparar la utilización de distintos marcadores moleculares RFLP, RAPD, AFLP y SSR, en el análisis de germoplasma de 12 cultivares de soja (Powell *et al.*, 1996), se incluyeron dentro de los 12 genotipos, dos líneas de *G. soja*. Analizaron un total de 136 bandas de AFLP (6 combinaciones de “primers”), 81 bandas RAPD, 110 *loci* RFLP y 36 *loci* SSR. Sobre sus cálculos del índice de contenido polimórfico detectaron el valor más alto para los marcadores SSR (0.60), RAPD (0.31), AFLP (0.32) y RFLP (0.41).

Los valores obtenidos en nuestro trabajo concuerdan con los resultados ya que el mayor valor obtenido fue el de marcadores SSR (0.601), siendo el mismo valor, habiendo analizado 6 marcadores SSR menos, el valor de RAPD (0.38) fue apenas más elevado en nuestro

caso, habiendo utilizado menos marcadores RAPD y con respecto a los AFLP (0.255), se obtuvieron un valor menor de contenido polimórfico que el trabajo mencionado.

Al realizar la comparación de los coeficientes de correlación entre las distintas tecnologías estudiadas, los valores dentro de las variedades cultivadas (*Glycine max.*), fueron relativamente bajos al igual que nuestros trabajos, sugiriendo que diferentes componentes de la variación de ADN, sujetos a distintos mecanismos evolutivos, son medidos de manera distintas por los distintos tipos de marcadores moleculares.

Por los antecedentes mencionados anteriormente, es claro que nuestro estudio se ha enfocado sobre los marcadores SSR, AFLP y RAPD, comparando con los datos obtenidos de las características morfológicas con el fin de determinar la relación genética entre variedades, establecer cual tecnología se acerca más a la “realidad genética” y conocer qué información podrían brindarnos cada uno de los sistemas analizados.

Sobre la comparación de los niveles de polimorfismo (promedios de índices de contenido polimórficos, PICs) detectados por distintos tipos de marcadores moleculares, cuyos trabajos fueron mencionados anteriormente (Morgante *et al.* , 1994; Powell *et al.* , 1996; Rongwen *et al.* , 1995; Tanksley *et al.* , 1996), éstos indican la hipervariabilidad de los *loci* SSR en comparación con otros sistemas moleculares.

Resumiendo, en el presente estudio se observaron los mismos resultados, demostrando también la mayor variabilidad revelada por los marcadores SSR, produciendo mayor información, con respecto a los marcadores RAPD y AFLP.

Los altos niveles de polimorfismo asociados con los SSR se deben principalmente a la diversidad genética generada principalmente por el proceso de replicación–deslizamiento, “slippage” (Tautz D. *et al*, 1984; Tautz D. *et al.*, 1986) más que por simples mutaciones puntuales de nucleótidos y/o transposiciones.

Con respecto a las técnicas de AFLP y RAPD, han mostrado valores de promedios de índices de contenido polimórfico (PIC), menores a los SSR, concordando que ambas tecnologías (AFLP y RAPD) son técnicas de tipo dominante, lo cual implica que brindan menor información con respecto a los SSR (técnica co-dominante).

Pero al observar la capacidad de los sistemas analizados de producir mayor cantidad de bandas por análisis (y por lo tanto mayor grado de cobertura simultánea en número de *loci* genómicos analizados), los AFLP demostraron ser los más eficientes (sobre 5 combinaciones de “primers” se obtuvo un total de 189 bandas totales, de las cuales 32 fueron polimórficas) en contraposición con los RAPD para los que fue necesaria una mayor cantidad de análisis, para

obtener prácticamente el mismo número de marcadores polimórficos (sobre los 22 “primers” seleccionados se obtuvo el total de 189 bandas, de las cuales 31 fueron polimórficas).

Varios estudios previos (Powell *et al.*, 1996; Zabeau M., *et al.*, 1993), demostraron la capacidad de multiplex que presentan los AFLP, junto con los altos niveles de polimorfismo que detectan, debido a que pueden ajustarse los ensayos intercambiando enzimas de restricción junto con el grado de extensión del nucleótido 3' en los “primers”, ofreciendo un alto grado de flexibilidad en los experimentos. Si bien se logró obtener mayor número de bandas por ensayo, el grado de polimorfismo encontrado fue relativamente bajo, ofreciendo poca información para lograr relacionar las variedades entre sí.

Una explicación de estos resultados es que el tipo de variabilidad evidenciada por los AFLP (fundamentalmente mutaciones puntuales) no es la más adecuada para este fin. Otra explicación a ello, sería que la combinación de enzimas de restricción o bien los “primers” utilizados no fueron los más adecuados, para mostrar el máximo polimorfismo.

Posteriormente se obtuvieron las matrices de similitud por el programa NTSYS-PC versión 1,8 del “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System”, utilizando el índice de Jaccard, conocido por producir el menor grado de distorsión (Sneath y Sokal, 1973), para cada sistema analizado (datos de características morfológicas, SSR, RAPD y AFLP).

Se calcularon los valores promedios de similitud y se compararon entre ellos. Revelaron que el promedio de similitud genética más bajo fue el obtenido con los marcadores SSR (0.2619, -0.009-), luego valores semejantes se obtuvieron para ambas técnicas dominantes, RAPD y AFLP (0.406, -0.016- y 0.397, -0.022-, respectivamente) y para los datos de las características morfológicas le correspondió el valor más alto (0.574, -0.012-). Mostrando la hipervariabilidad y el alto poder de resolución que presentan los marcadores SSR. Es importante aclarar que sólo fueron computados los datos polimórficos, para cada sistema analizado.

Diversos factores pueden afectar la estimación de la diversidad genética entre los individuos, principalmente, el número de marcadores utilizados y la distribución de marcadores en el genoma (cobertura del genoma) (Powell *et al.* , 1997).

El número de marcadores utilizados, puede ser insuficiente para lograr una buena relación genética entre las variedades estudiadas, necesitando aumentar el número de los mismos.

Con respecto a la cobertura del genoma se pueden ver afectados los valores de similitud cuando se contabilizan marcadores genéticamente ligados, que estén confiriendo resultados no independientes entre sí.

La información sería la misma y produciría una distorsión al darle mayor valor relativo a diferencias localizadas en la misma región cromosómica, es decir, un error de muestreo en este caso de los marcadores, que en definitiva conllevaría el mismo problema que el presentado al utilizar escasos números de marcadores (también se puede cometer error de muestreo).

De los sistemas utilizados en esta tesis, sólo en el caso de los microsatélites (SSR) y en el caso de algunos caracteres morfológicos, se tienen bien caracterizadas las posiciones de los mismos en el mapa genético de la soja, estando por lo tanto al resguardo del segundo de los posibles errores (asumir independencia de las variables cuando no es así). En el caso de los microsatélites, de 20 grupos de ligamiento posibles, se cubrió la totalidad de 16 de los mismos, estando bien dispersos uno del otro, para generar una buena cobertura del genoma.

Se observa en la **Figura 15**, el mapa de soja y la posición de los 30 *loci* SSR estudiados.

Fig. 15: Comparación de tres mapas genéticos de 20 grupos consenso de ligamiento de soja definidas por tres poblaciones distintas. The USDA/Iowa State, *G. max* x *G. soja* F2; The Univ. of Utah, Minsoy x Noir F2; Univ. of Nebraska, Clark x Harosoy F2 y el correspondiente mapa de ligamiento clásico. Los números entre paréntesis indican las diversidades genéticas por 100. Se indican con colores la posición de los *loci* SSR estudiados, para el análisis de 100 variedades Argentinas de soja.

GRUPO DE LIGAMIENTO A1/U07

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

A1	cM	U07	cM	CH24	cM
A487H	5.1	Satt276 (72)	9.7	A676I_2	2.5
Satt276 (72)	0.6	Satt165 (66)	4.9	A036I_3	---
Satt572 (18)	8.9	Satt364 (56)	0.8		2.5
Satt165 (66)	2.4	Satt382 (74)	0.0		
Satt382 (74)	1.0	Satt248 (18)	0.0		
Satt593 (62)	1.1	Satt042 (74)	0.5		
Satt454 (56)	0.0	Satt471 (62)	1.9	CH20+44	cM
Satt526 (32)	0.0	A329	1.4	Satt276 (72)	0.0
Satt364 (56)	0.0	Satt591 (66)	0.0	A083H_2	0.6
Satt471 (62)	0.0	K258	0.9	A065V_2	0.8
Satt042 (74)	1.5	Satt300 (70)	0.0	Satt572 (18)	8.5
K478V_2	1.5	Satt155 (70)	1.0	K647I_2	0.0
Mng241V	0.8	Satt073 (32)	0.3	Satt593 (62)	1.8
Bng074V_2	4.2	A110a	0.2	Satt165 (66)	0.0
Satt300 (70)	0.0	L194b	0.2	Satt382 (74)	1.7
Satt591 (66)	1.4	G214h	0.2	Satt042 (74)	0.0
Satt155 (70)	3.6	A053b	6.5	Satt471 (62)	1.0
A407T_2	0.0	A064b	0.0	Satt300 (70)	18.0 ***
Bng116T	2.9	R183	2.1	B030I_2	20.3 ***
Bng132D_1	7.8	Satt050 (34)	9.2	SYNOD26A(58)	0.2
A510H_1	1.6	T153b	1.6	Satt385 (70)	9.1
R183H	3.8	A262c	11.3	Satt545 (80)	4.9
Satt050 (34)	1.6	Satt385 (70)	3.8	A256V_2	16.0
B030T	2.2	BL053b	1.6	Satt208 (77)	0.3
A096H_1	1.6	Satt545 (80)	3.3	Satt511 (75)	0.0
K400D	8.2	A975a	5.4	Satt258 (66)	0.0
B172H	8.1	K636	9.4	Satt236 (75)	0.9
Satt385 (70)	3.2	Satt174 (61)	3.5	Satt225 (62)	0.0
A975D	3.6	Satt200 (77)	0.5	Satt211 (50)	---
A256V_2	6.5	T155	0.0		84.1
Satt599 (48)	3.2	Satt236 (75)	0.5		
Satt211 (50)	0.9	Satt511 (75)	0.8	Weak Link	
Satt511 (75)	0.0	Satt258 (66)	0.0	Bng161H2	---
Satt236 (75)	0.0	B170	0.0		
Satt225 (62)	2.0	Satt225 (62)	---		
A170T	0.8		82.1		
A104D	0.0				
Bng077I_1	5.3				
A082H	1.0				
Bng017D	---				
	96.8				

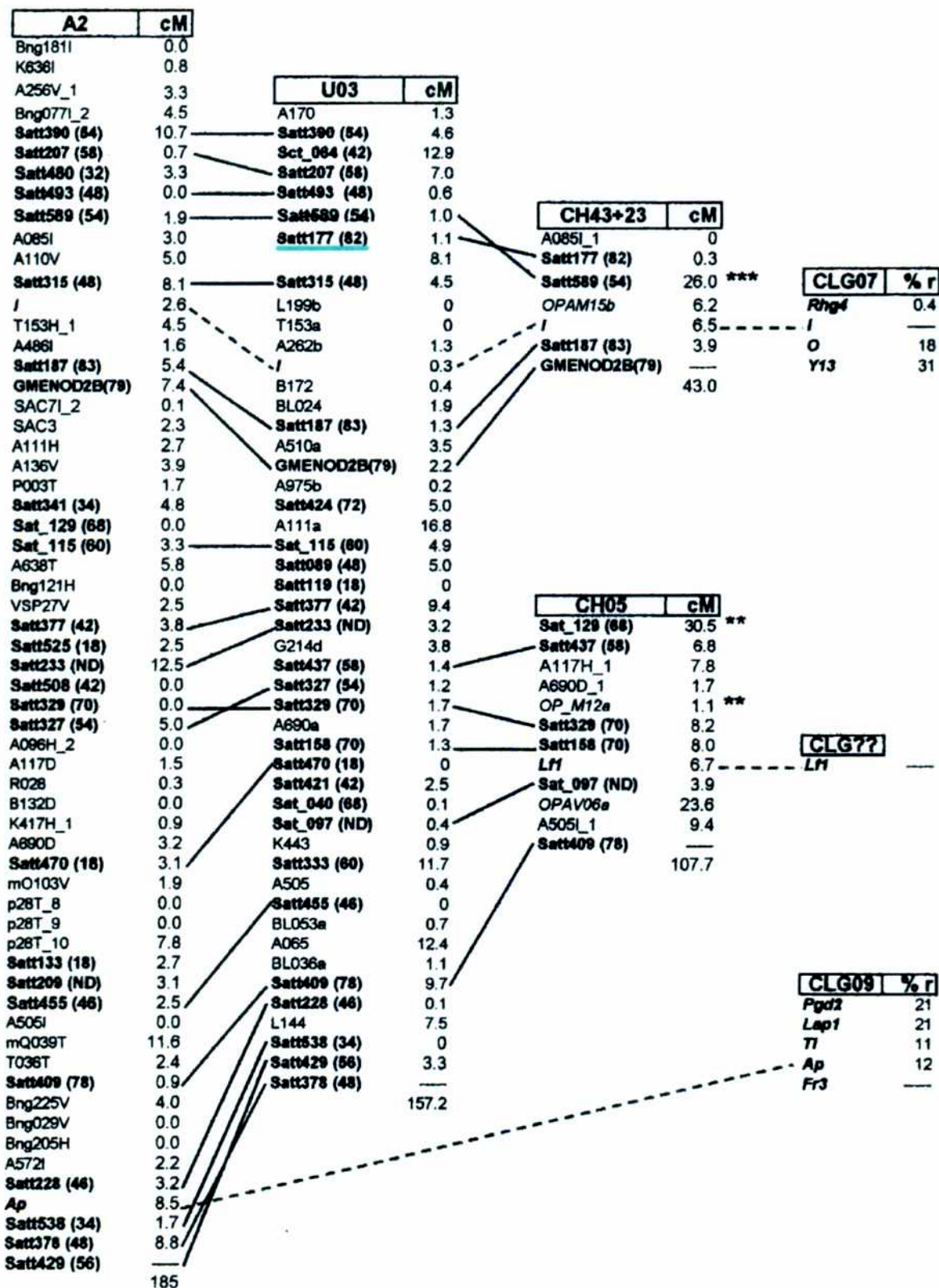
GRUPO DE LIGAMIENTO A2/U03

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical



GRUPO DE LIGAMIENTO B1/U04

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

B1	cM
----	----

A333I	0.0
T028I	0.0
B219V_1	11.4
A588I	0.0
Bng061I	9.3
A702H	1.8
Satt426 (48)	2.2
A109I	2.0
Satt509 (78)	0.0
Mng415H	5.6
A129V	0.0
A632H	0.9
Bng182T	0.0
A847H	0.9
B031H	0.0
Bng158T	0.1
A381I	0.4
pcr2_168	0.3
Satt251 (48)	4.1
Satt197 (74)	6.0
Sat_128 (70)	1.8
H3_28E	5.0
A089D_2	2.3
A118T	0.0
A520T	2.5
Satt519 (48)	2.7
A006V	5.3
mO011I	3.5
Satt597 (54)	3.5
Sct_026 (64)	1.7
Satt332 (18)	0.0
Satt415 (74)	0.8
Satt583 (74)	0.7
Satt430 (86)	1.6
Satt444 (18)	15.5
Sat_123 (66)	0.2
Satt359 (50)	19.2
R244H	1.7
H3_c6E	0.5
A598D	0.3
A567H	3.5
Satt453 (58)	0.0
Satt484 (46)	—

117.6

U04	cM
-----	----

T028	17.5
K011a	21.0
A109c	3.9
Satt509 (78)	13.9
Satt197 (74)	7.7
A262a	3.2
T092	13.5
K1	0.9
BL043	0.0
Satt298 (60)	9.2
Sct_026 (64)	0.2
G214e	1.8
L204e	0.8
Satt430 (86)	0.0
Satt583 (74)	0.0
Satt415 (74)	0.1
Sat_096 (ND)	19.1
Satt359 (50)	1.9
Sat_123 (66)	24.5
L050q	8.1
Satt453 (58)	—

145.9

CHex01 + CH10x+10y	cM
-----------------------	----

D2	23.5 ***
A588I_1	3.7 *
A381I_2	13.5 *
OP_Q17	6.5
Satt509 (78)	0.0
Aco4	5.4
A847H_1	8.7
Satt197 (74)	11.7
Sat_128 (70)	27.2 **
Satt519 (48)	12.1
Satt298 (60)	13.9
Satt597 (54)	4.9
Sct_026 (64)	9.7
Satt583 (74)	0.4
Satt415 (74)	15.4
Sat_123 (66)	—

156.6

CLG??

D2
CLG??
Aco4

GRUPO DE LIGAMIENTO B2/U26

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

B2	cm
----	----

Satt577 (68)	6.6
A523V	0.7
BLT13H_2	0.0
A043T	1.8
A135D	0.7
A685I	13.5
A343V_1	0.0
A242T_1	5.1
A352H	1.5
Satt126 (46)	9.8
Bng069T_2	0.1
Satt467 (18)	16.0
Satt168 (77)	2.2
Satt416 (76)	4.4
A018T	1.5
BLT049H_2	2.2
A329V	3.2
Satt304 (42)	0.9
Satt083 (ND)	3.3
A509T	2.6
Satt801 (32)	2.2
Satt318 (42)	1.9
Sct_094 (68)	0.0
Mng003V	0.0
B153T	5.9
Satt556 (82)	2.5
Satt020 (59)	8.7
Satt066 (70)	7.6
Mng474D_1	0.0
B124	6.0
Sct_064 (18)	0.0
Satt534 (66)	0.0
A741I	1.1
B194H_1	1.1
Satt063 (64)	3.7
mR048V	0.0
A516H	0.0
A593H	4.6
A519T_1	0.5
Mng247T	9.7
T005T	0.0
B221	0.0
A230T	0.0
H3_60H	7.4
A427T_1	0.0
A404H_2	0.0
A183	—

139.6

U26	cm
-----	----

Satt577 (68)	9.4
L191	2.1
T270	9.2
Satt126 (46)	27.7
Sct_034 (42)	4.7
Satt168 (77)	1.5
Satt416 (76)	7.7
Sat_083 (62)	3.0
Satt556 (82)	0.0
Satt474 (50)	0.0
Satt070 (68)	0.1
Sct_094 (68)	0.1
Satt272 (58)	0.1
Satt122 (50)	0.1
Satt020 (59)	0.1
G214r	0.2
BL057	0.9
L201	0.2
G214s	3.6
Satt066 (70)	8.9
Satt534 (68)	12.6
A516	3.1
A234	10.8
Satt580 (64)	10.8
G214t	—

106.6

CHex02	cm
--------	----

Satt577 (68)	23.2 ****
BLT013T3	22.7 ***
A685I_1	—
	46.0

CH17+55+15	cm
------------	----

B142D_1	6.4
OP_T02	6.4
A352I_1	0.0
Satt126 (46)	23.7 *
Satt168 (77)	1.9
Satt416 (76)	15.4 *
A584V_2	8.4 *
OP_E02a	1.2 *
Sat_009 (84)	2.2
CAAGTG450	0.0
Satt070 (66)	0.4
DOP_F04	0.5
Satt474 (50)	0.9
Satt556 (82)	0.0
Sct_094 (68)	0.0
OP_D01c	0.0
OP_C09	0.0
OPAF15a	2.5
Satt272 (58)	0.0
Satt020 (59)	10.9
Satt534 (66)	5.1
Satt063 (64)	6.7
A516H_1	0.0
A593H_1	0.0
CAAGTG240	6.3
A519T_1	—

CLG17	% r
-------	-----

Idh2	28
Fan	22
Fas	—

CLG??	
-------	--

Rps5 (?)	—
----------	---

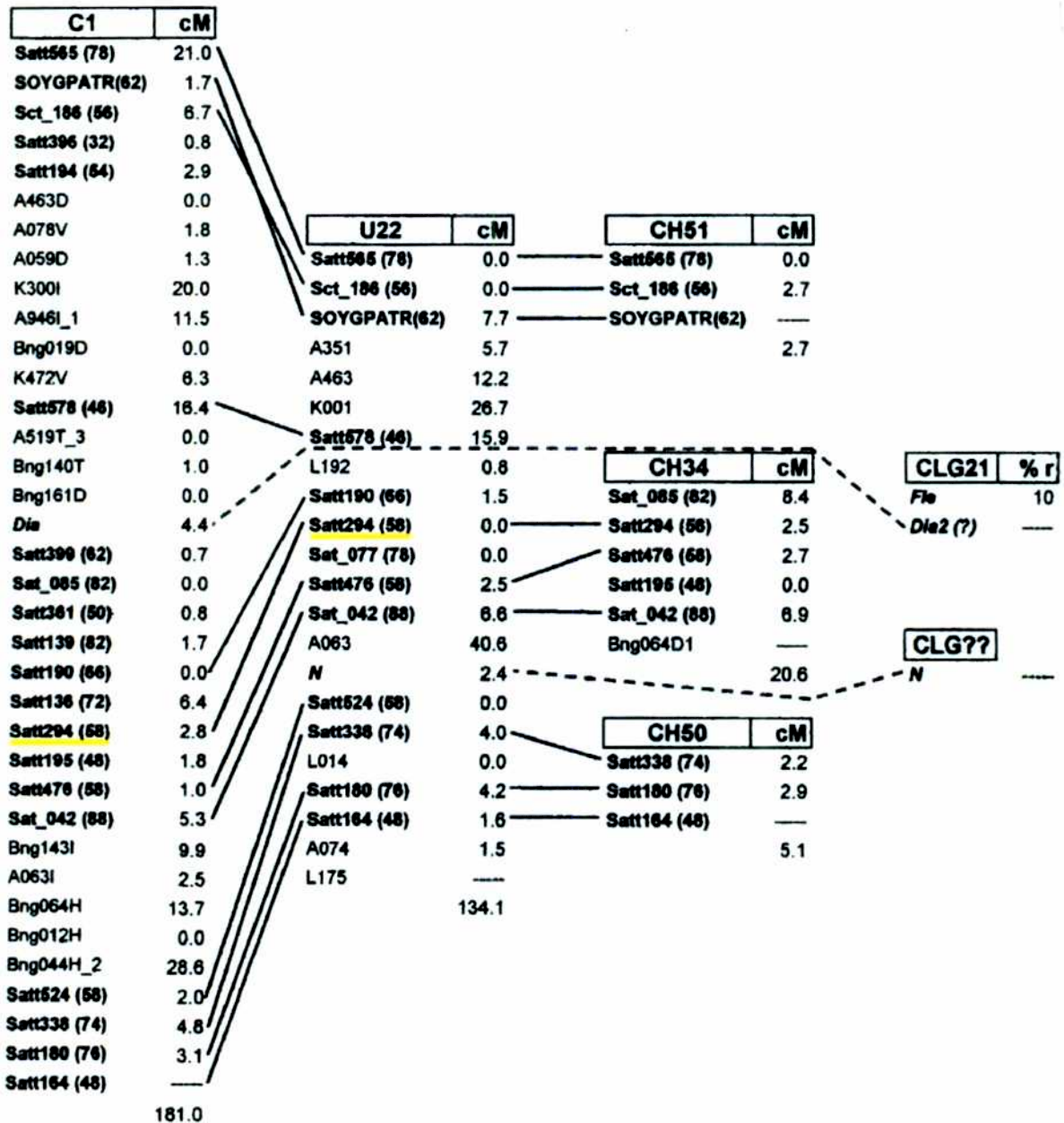
GRUPO DE LIGAMIENTO C1/U22

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical



GRUPO DE LIGAMIENTO C2/U09

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

C2 cM

A121H	14.1
Bng035I	0.8
A122D	7.0
Bng132D_2	3.5
Satt227 (32)	3.8
Sat_062 (ND)	4.8
mQ086T	0.0
mO008H	11.9
Satt520 (70)	2.3
Satt291 (34)	4.1
A655H	3.2
A338V	22.4
Satt170 (18)	3.3
GMAC7L (ND)	3.4
Satt322 (48)	4.2
Bng228V	0.0
K262H	2.6
K255I	0.0
Bng014I	1.9
A426T_1	19.5
Satt450 (0)	8.8
B160I	0.8
A635T	0.0
L148V	5.2
Satt363 (70)	0.9
Sat_076 (73)	0.0
Satt286 (70)	9.0
Sle28H_1	1.3
Satt277 (70)	0.9
Satt365 (54)	1.2
Satt557 (64)	0.8
Satt289 (48)	0.0
Satt134 (62)	1.0
Bng164I	0.9
Satt100 (56)	0.0
pcr2_150	2.2
Satt319 (34)	4.3
B131I	1.3
A397D	7.7
BLT029I	0.0
A538H	0.0
P029T	0.0
K474D_1	0.9
K365H	0.0
K474I_2	0.0
A748I	5.8
Satt460 (48)	2.5
Satt307 (76)	0.0
Sct_028 (70)	3.6
Satt316 (76)	2.0
Satt202 (66)	3.3
C056	9.0
A676H	2.5
Satt371 (74)	4.8
Satt357 (54)	—

Weak Link

Satt205 (54)

U09 cM

A121	12.8
Sat_130 (62)	10.3
A059	1.6
L199a	0.6
A262d	9.3
Sat_062 (ND)	5.9
Satt432 (18)	2.7
Satt281 (86)	3.1
Satt520 (70)	0.0
Satt422 (74)	0.1
Satt291 (34)	31.8
Satt170 (18)	3.4
A426	1.2
GMAC7L (ND)	9.5
L059	8.5
Satt363 (70)	0.0
Satt376 (48)	0.0
L148	0.8
R092	0.4
Sat_076 (73)	1.2
Satt286 (70)	2.2
BL032a	3.2
Satt277 (70)	4.5
Satt557 (64)	0.0
Satt365 (54)	0.6
Satt489 (66)	0.0
Satt319 (34)	0.0
Satt134 (62)	0.0
Satt289 (48)	0.0
A109a	0.2
L050c	0.0
Satt100 (58)	1.5
Satt460 (48)	0.0
A397	0.4
Satt079 (58)	0.9
BL029	0.4
K365	0.6
Satt307 (76)	0.0
Sct_028 (70)	3.3
Satt316 (76)	1.2
Satt202 (66)	3.6
C056	20.5
Satt371 (74)	4.3
A676	2.9
Satt357 (54)	—

154.4

CH57+18+
53+06+25

cM

Pgi	4.3
Sat_130 (62)	25.8 *
A109H_3	16.5
Sat_062 (ND)	4.6
OP_E08	7.9
Satt422 (74)	2.6
A655H_1	2.7
Satt457 (32)	25.8 *
Satt305 (64)	8.8
A426T_1	31.9 ****
R092V_3	3.3
A063I_2	2.2
A635T_1	0.4
L148V_1	1.0
Sat_076 (73)	2.7
Satt286 (70)	5.0
Satt277 (70)	2.5
K011T_3	2.4
T	22.8 *
P029T_1	0.0
A538I_1	1.3
Satt307 (76)	0.0
Sct_028 (70)	2.2
Satt433 (58)	0.0
A748V_1	1.2
Satt316 (76)	3.3
Satt202 (66)	16.2
Satt371 (74)	10.7
R183T_2	—

208.1

CLG??

Pgi

CLG01 % r

Aco3	12.0
Sp1	13.0
Y12	20.0
E1	4.0
T	—
Df5	15.0
Fg3	14.0
T	—
Fg4	4.0
Fg3	12.0
Fg4	—

Classical

229

GRUPO DE LIGAMIENTO D1b + W/U19

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

W	cM
Satt216 (??)	4.5
Bng097T_2	5.7
A725	4.7
A481	—
	14.9

D1b	cM
Satt157 (80)	11.8
Satt558 (34)	8.5
Satt296 (46)	5.3
Satt266 (32)	5.5
A605V	1.7
A747I	3.7
Bng047D	0.0
Mng137I	1.8
Satt428 (66)	0.0
Satt579 (72)	0.0
Satt282 (68)	0.0
Satt290 (54)	0.8
Satt537 (76)	0.0
Satt005 (84)	0.0
Satt600 (72)	0.8
Satt604 (34)	0.0
Satt189 (71)	0.0
Satt506 (46)	0.0
Satt141 (82)	0.3
Satt350 (76)	0.8
Sat_135 (84)	5.0
Satt041 (59)	3.6
B194H_2	0.5
Satt546 (32)	7.9
A519T_2	8.2
Satt172 (74)	3.4
Satt274 (46)	3.6
L161V	1.7
A343V_2	0.4
K411	3.8
T270T	6.3
B139V	2.1
BLT013H_1	6.4
Satt271 (64)	—

U19	cM
Sat_096 (ND)	6.5
A725	6.1
L216b	10.4
Satt095 (74)	12.2
Satt157 (80)	4.1
Satt558 (34)	8.0
Satt296 (46)	0.0
Satt542 (64)	20.6
Satt412 (66)	4.4
Satt290 (54)	1.1
Satt189 (71)	0.3
Sat_135 (84)	0.1
Satt600 (72)	0.1
L050g	0.0
Satt579 (72)	0.0
Satt604 (34)	0.0
Satt537 (76)	0.0
Satt350 (76)	0.0
Satt506 (46)	0.1
Satt141 (82)	0.1
Sat_069 (77)	0.2
K011b	7.1
Satt041 (59)	2.9
Satt546 (32)	18.1
Sat_069 (83)	18.1
G214a	1.5
A343	3.4
Satt459 (42)	12.3
A135a	0.4
BL013	1.5
Satt271 (64)	—

CH33x+33y+ 26b+28x+28y	cM
Satt216 (??)	15.8
Satt095 (74)	14.6 *
A586T_3	3.5
Satt157 (80)	30.2 *
Satt542 (64)	8.1
Satt266 (32)	6.6
A605V_1	5.6
Sat_135 (84)	5.2
Satt428 (66)	0.0
Satt290 (54)	0.0
Satt282 (68)	0.0
Satt579 (72)	0.0
Satt537 (76)	0.0
Satt412 (66)	0.9
Satt005 (84)	0.0
Satt600 (72)	0.0
Satt350 (76)	0.4
Satt141 (82)	21.6 **
CGGGAC300	6.0
CGGGAC400	9.8
CGGGAC230	12.9
ldh1	0.2
Sat_069 (83)	2.1
Satt172 (74)	8.3 *
Satt459 (42)	2.0
OPAM15c	22.5
A135V_2	11.4
Satt271 (64)	—

CLG??

Rps4 (?)

CLG11 % r

Rj1 27
ldh1 25
F —

92.7

139.6

166.5

GRUPO DE LIGAMIENTO D2/U12

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

D2	cM
----	----

Sctt008 (32)	2.9
A095T	12.2
A257V	17.4
A124H	0.0
B146D	2.2
Satt135 (66)	0.0
Satt458 (78)	2.9
Satt014 (18)	3.1
Satt498 (00)	0.9
Satt486 (32)	4.7
Satt372 (76)	13.0
Satt002 (66)	6.0
Satt154 (64)	1.6
Satt562 (18)	5.8
Satt443 (00)	4.1
Satt397 (50)	1.9
A083T	2.1
Satt208 (48)	3.2
Satt447 (00)	2.6
pcr2_182	2.7
K258i	4.5
Satt389 (76)	5.8
Satt461 (42)	4.2
K286V	2.0
i6_2D	0.8
Satt311 (76)	1.2
Sat_114 (72)	0.0
Satt514 (72)	0.0
Satt226 (70)	1.7
Satt528 (64)	0.9
Satt484 (48)	1.7
Satt543 (76)	0.0
Satt082 (64)	0.0
Satt488 (58)	1.7
Satt574 (46)	5.2
BLT049H_3	1.2
Sat_001 (64)	1.6
Satt301 (80)	11.7
Sat_022 (64)	5.6
Satt186 (74)	3.9
Satt310 (64)	5.3
Satt031 (62)	0.0
Satt413 (64)	0.0
A141T	6.5
Sct_137 (18)	0.0
Satt256 (58)	0.0
Satt386 (58)	0.0

155.2

U12	cM
-----	----

BL032b	2.1
A064a	7.4
L072	2.2
Sctt008 (32)	9.2
Satt328 (18)	0.0
A401a	1.3
G214i	3.4
A124	1.9
Satt458 (78)	0.8
Satt135 (66)	17.2
Satt002 (66)	9.0
Sat_092 (79)	0.4
Satt154 (64)	9.8
Satt389 (76)	4.9
Satt311 (76)	0.0
Fr2	3.2
Satt543 (76)	2.9
Sat_001 (64)	0.4
G214j	0.0
Satt301 (80)	0.6
L026b	1.2
K011c	5.8
L204c	14.7
A141a	0.9
Sat_086 (80)	6.7
Satt256 (58)	0.4
Satt386 (58)	3.4
Sct_137 (18)	—

121.5

CH13+ 29/35+37	cM
-------------------	----

A095T_1	0.0
Sctt008 (32)	13.5 ***
A401T_2	22.5 *
Satt458 (78)	9.1
Satt014 (18)	0.8
Satt486 (32)	6.3
Satt372 (76)	1.5
Mdh	7.4
Satt002 (66)	7.5
Sat_092 (79)	0.1
Satt154 (64)	20.2
Satt208 (48)	1.1
OP_M15	2.3
CAAGTG360	7.4
K258H_2	0.0
Satt389 (76)	5.3
OPAD11c	2.0
Satt082 (64)	2.0
Satt488 (58)	0.0
Satt226 (70)	1.2
Satt543 (76)	0.0
Sat_114 (72)	0.0
Satt528 (64)	0.0
Satt514 (72)	0.9
Satt311 (76)	0.0
Satt461 (42)	3.5
Sat_001 (64)	0.0
Satt301 (80)	21.9 **
OP_F14	3.3
Satt186 (74)	4.3
Sat_022 (64)	0.7
Satt413 (64)	2.7
Satt031 (62)	6.8
Satt256 (58)	0.0
Satt386 (58)	—

154.9

CLG20	% r
-------	-----

Rxp 16

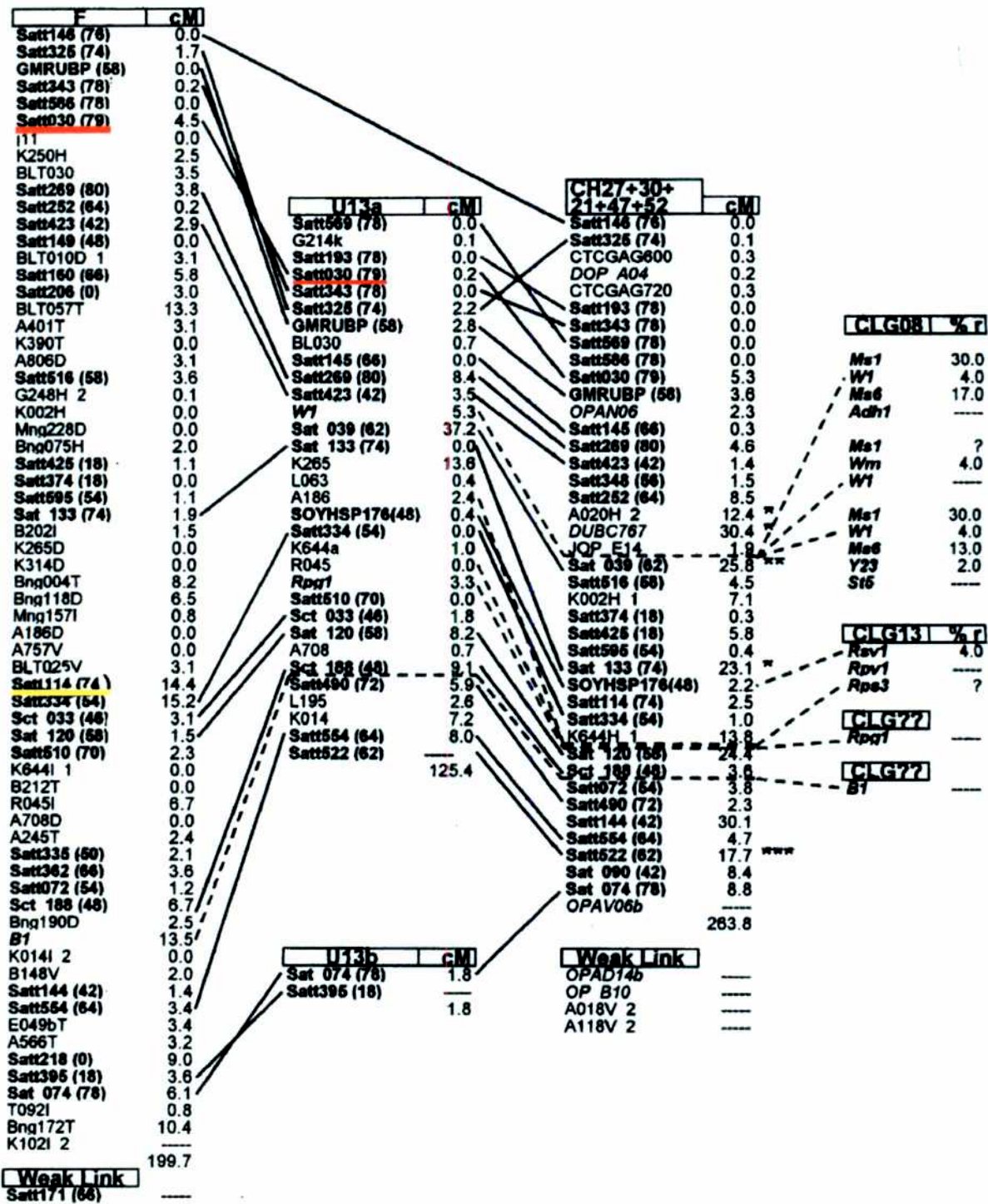
Mdh (7) —

CLG??

Fr2 —

GRUPO DE LIGAMIENTO E/U18 + U02

<u>USDA/Iowa St. Univ.</u>		<u>Univ. of Utah</u>		<u>Univ. of Nebraska</u>		<u>Classical</u>	
<u>E</u>	<u>cM</u>	<u>U18</u>	<u>cM</u>	<u>CH39+ 03x+03y</u>	<u>cM</u>	<u>CLG14</u>	<u>% r</u>
Sett212 (42)	12.3	A135b	0.0	T092T_2	8.1		
Sett213 (80)	4.0	T183	2.7	Set_112 (72)	0.1		
Sett384 (42)	2.0	Sett575 (18)	6.2	Sett411 (46)	28.7 **	Pb	27
Set_112 (72)	2.1	Set_112 (72)	9.6	Y9	15.9	Y9	—
SAC7I_1	2.1	G214n	2.1				
A242T_2	0.0	A053a	0.4	A881V_2	3.3		
Sett411 (46)	0.4	L194a	0.0	A089D_2	29.4 *		
Pb	2.8	Sett384 (42)	—	A702I_4	11.1		
A053I	8.0		21.1	A646D_1	0.0		
A617D	0.0			A454D_1	1.6		
A636V	2.7			OP_M12b	1.1		
Bng183D	0.0			Sett573 (48)	0.0		
K229V	2.7			Sett598 (48)	3.0		
A454H	0.0			A856H_1	2.0		
B174D	2.8			Set_136 (??)	7.6		
A203T	3.6			K274D_1	0.0		
A374H	8.6			R013I_1	1.8		
A983I	0.0			Sett945 (72)	1.0		
Bng027H	4.4			A598T_2	0.0		
por2_188	5.4			Sett992 (84)	0.1		
T153H_2	0.5			por21101	0.2		
Set_124 (72)	4.0			OPAN07	0.2		
A089H	5.4			OPAG19	0.3		
A458V	0.0			DOP_G06	0.2		
A455D	0.0			Sett983 (78)	0.0		
R051V	0.0			Sett181 (46)	0.0		
A646D	12.7			Sett185 (80)	0.0		
A856H	0.4			Sett268 (86)	0.0		
A398T	4.6			Sett346 (86)	0.0		
Bng107I	0.0			Sett983 (80)	0.0		
R013I_1	0.9			Sett452 (72)	0.3		
A427T_3	0.9			Sett263 (72)	0.6		
A597V	0.0			Sett991 (46)	0.4		
K477V	0.0			Set_167 (84)	0.0		
BLT049H_5	6.6			Sett294 (88)	5.5		
Sett185 (80)	0.7			OP_N14	1.2		
Sett268 (86)	0.0			OP_M02b	0.7		
Sett294 (88)	0.0			OPAG03	0.0		
Sett263 (72)	0.0			OP_K16	4.1		
Set_167 (84)	1.6			A597D_1	6.4		
Sett346 (86)	1.3			OP_D01	27.6		
Sett945 (72)	13.0			A136V_2	5.1		
Sett369 (84)	18.4			Sett369 (84)	14.6		
Sett231 (70)	2.9			Sett231 (78)	1.3		
Sett230 (68)	—			Sett543 (78)	0.0		
				Sett230 (68)	—		
	138.3				183.9		



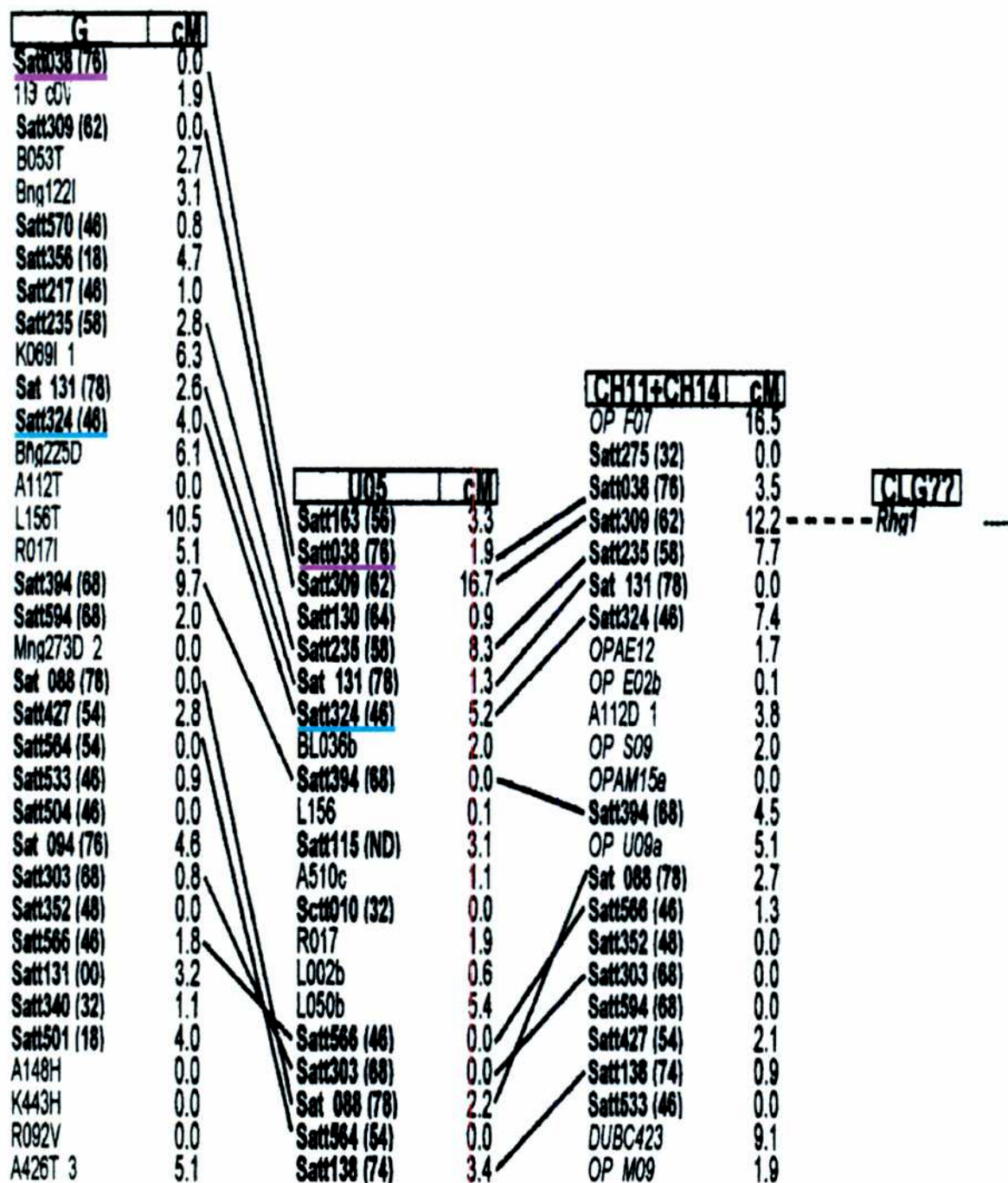
GRUPO DE LIGAMIENTO G/U05

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical



GRUPO DE LIGAMIENTO H/U10

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

H	cM
---	----

Bng154H	2.0
Bng067H	9.9
A381D	6.7
A132H	3.0
mR051H	1.8
H328I_2	0.1
mO091V	4.1
Satt568 (42)	0.0
Sat_127 (ND)	4.3
K009D	0.0
A069D	0.0
A089D_1	0.7
A036I	8.5
Satt192 (62)	4.1
Sctt009 (42)	2.0
Bng145D	2.4
pcr2_175	6.7
A703D	4.4
A130I	0.7
A404H_1	7.1
Satt541 (58)	0.0
Satt469 (18)	1.7
Sat_122 (86)	0.9
Sat_118 (82)	6.2
Satt314 (46)	0.0
Satt279 (70)	0.8
Satt222 (00)	0.0
Satt253 (64)	5.2
Mng374H	0.0
Bng104V	0.0
Bng202V_1	0.0
Mdh	6.4
K327H	5.6
B069I	10.5
A810H	4.6
Satt302 (58)	6.5
Satt142 (70)	0.0
Satt293 (66)	8.4
Satt181 (64)	12.8
A858H	0.0
B072H	4.3
K014I_1	2.6
L195V	0.3
A570I	2.0
A162T	5.1
Satt434 (66)	10.5
K007	—

163.4

Weak Link

Satt246 (48)

U10	cM
-----	----

L185	9.8
Satt353 (48)	2.5
A381	3.0
R249a	23.1
A089	10.5
Satt192 (62)	1.2
Satt442 (66)	1.3
BL053c	1.3
BL046	9.8
A131	0.0
A404	1.2
Sat_122 (66)	0.9
Satt052 (54)	1.4
Satt279 (70)	0.7
Satt253 (64)	0.0
Satt314 (46)	5.4
BL019a	7.4
Ps	3.8
Satt302 (58)	5.0
Satt293 (66)	0.0
Satt142 (70)	4.1
A748	0.1
Satt317 (54)	17.8
Satt434 (66)	9.5
K007a	—

120.0

CH38/41	cM
---------	----

Satt442 (66)	7.3
Sctt009 (42)	3.6
Satt192 (62)	14.2
A404T_3	2.3
Satt541 (58)	0.0
Satt469 (18)	3.9
Sat_118 (82)	4.8
Satt253 (64)	1.8
Satt279 (70)	0.0
Satt314 (46)	0.0
JOP_C07	1.3
DUBC413	17.3
Satt302 (58)	5.4
Satt293 (66)	0.0
Satt142 (70)	11.4
B148T_2	—
	73.2

CLG??

Nts

CLG20 % r

Rxp 16.0

Mdh (?)

CLG??

Ps

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah
GRUPO DE LIGAMIENTO I/U17

Univ. of Nebraska

Classical

I	cM
---	----

Satt451 (46)	0.0
Satt571 (72)	2.4
Satt419 (68)	7.4
Satt367 (60)	5.7
Satt127 (34)	1.0
Satt587 (34)	1.7
B214H_2	0.0
A144H	0.0
A688D	3.5
L185H_1	0.7
Mng371H	0.2
i6D_1	0.9
K011I_1	0.1
A407T_1	1.7
Satt239 (66)	0.0
Satt496 (64)	11.9
Satt364 (76)	6.7
A515I	9.3
L048I	0.8
A955H	3.9
Sat_105 (34)	0.0
Satt270 (72)	5.5
Satt049 (32)	9.2
A102T_1	1.4
Satt330 (34)	3.4
Satt292 (62)	7.1
Satt146 (66)	4.0
GMLPS12 (48)	2.0
Satt162 (58)	2.8
A007I	4.3
K287D	0.8
B039I	9.8
Bng168V	0.0
A664H_2	0.0
A644H	0.0
Bng155I	2.8
A510H_3	3.2
Sct_189 (66)	0.0
Satt440 (70)	—

114.6

U17	cM
-----	----

BL053d	0.2
T098	19.9
Satt571 (72)	2.1
Satt451 (46)	0.0
Satt419 (68)	5.4
Satt367 (60)	2.0
Satt587 (34)	2.1
Satt127 (34)	0.5
L204b	0.5
A352b	0.1
Sct012 (18)	0.1
BL002	0.8
Satt239 (66)	1.6
A109b	12.4
Satt364 (76)	0.8
Satt270 (72)	0.0
Sat_105 (34)	1.9
A955a	8.6
Satt049 (32)	4.2
K644b	0.0
Sat_104 (ND)	15.1
Satt330 (34)	3.6
Satt292 (62)	3.1
Satt162 (58)	11.7
GMLPS12 (48)	3.0
Satt146 (66)	11.5
L028a	0.9
L050f	1.7
K011d	3.0
Satt440 (70)	0.0
Sct_189 (66)	2.2
Chi	—

119.0

CH04+19	cM
---------	----

OP_E03	28.3
Satt587 (34)	6.6
Enp	21.8
Ln	6.0
Satt049 (32)	5.6
OPAF15b	0.0
K644H_2	23.4 ***
GMLPS12 (48)	6.3
Satt146 (66)	0.0
OP_Y10	2.2
B039H_1	9.3
Satt440 (70)	0.0
Sct_189 (66)	7.9
A664H_2	—
	115.5

CLG04	% r
-------	-----

Enp	9.0
Ln	—
V1	36.0
Ln	26.0
P2	—

CLG??

Chi

GRUPO DE LIGAMIENTO J/U01

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

J	cM
---	----

A363D_2	0.0
i1_2	0.0
Bng202V_2	6.0
B101T	0.0
Bng179T_1	3.8
Satt405 (34)	0.7
Satt249 (66)	2.6
Satt287 (42)	6.4
Sct_046 (46)	0.0
Satt285 (58)	5.9
A060T	2.8
B046L_2	8.1
A204T	1.6
B074H	5.5
E107H	0.0
mQ109V	1.7
pcr2_190	3.6
B166I	1.8
K384I	0.7
A450V_1	5.6
p40_2T_2	0.4
Bng044H_1	0.0
BLT049D_2	4.1
Sct_065 (54)	2.3
Satt596 (74)	0.0
Satt414 (72)	0.0
Scaa003 (18)	3.6
Satt280 (42)	0.0
Satt456 (54)	0.8
Satt406 (72)	2.8
Satt380 (58)	0.0
Sat_093 (80)	1.8
Satt183 (46)	1.8
Satt529 (54)	1.4
Sct_001 (54)	15.4
B122I	0.0
Bng063T	7.5
pcr2_135	5.7
K375I	1.1
Satt244 (74)	4.3
B032T_1	0.8
G8_15	3.7
Sle3_4mD	3.7
Satt431 (70)	1.9
A724T	0.0
A233D	4.9
A199H_2	0.0
pcr2_176	—

125.4

U01	cM
-----	----

Satt405 (34)	11.6
Satt285 (58)	0.0
A060a	3.1
Sct_046 (46)	25.3
Satt456 (54)	0.0
Satt529 (54)	0.0
L216a	0.2
L050a	0.0
Satt183 (46)	0.6
Satt596 (74)	0.0
Scaa003 (18)	0.3
Satt414 (72)	0.0
Satt132 (58)	0.4
g173a	0.8
Satt380 (58)	0.5
Sct_001 (54)	0.0
Satt215 (62)	22.8
Satt244 (74)	4.9
K375	1.8
R189	5.2
Satt546 (78)	4.9
G815	6.0
Satt431 (70)	9.5
A132	—

93.3

CH32+ 36+12	cM
----------------	----

Satt287 (42)	0.8
Satt249 (66)	7.6
Sct_046 (46)	0.0
Satt285 (58)	1.6
A060T_1	34.9 ***
pcr21901	6.0
Sct_065 (54)	5.2
Satt414 (72)	1.5
Satt596 (74)	0.9
Satt132 (58)	0.0
Satt406 (72)	1.7
Satt380 (58)	2.8
Sat_093 (80)	0.8
Sct_001 (54)	35.2 ***
Satt244 (74)	1.7
Satt547 (54)	0.7
JOP_E01	8.9
Satt431 (70)	3.8
A233D_1	0.0
JOP_F10	1.0
A724T_1	6.4
A199H_2	—

121.6

CLG19	% r
-------	-----

Aco2	45.0
Rj2	—
Rj2	2.0
Rmd	2.0
Rps2	—

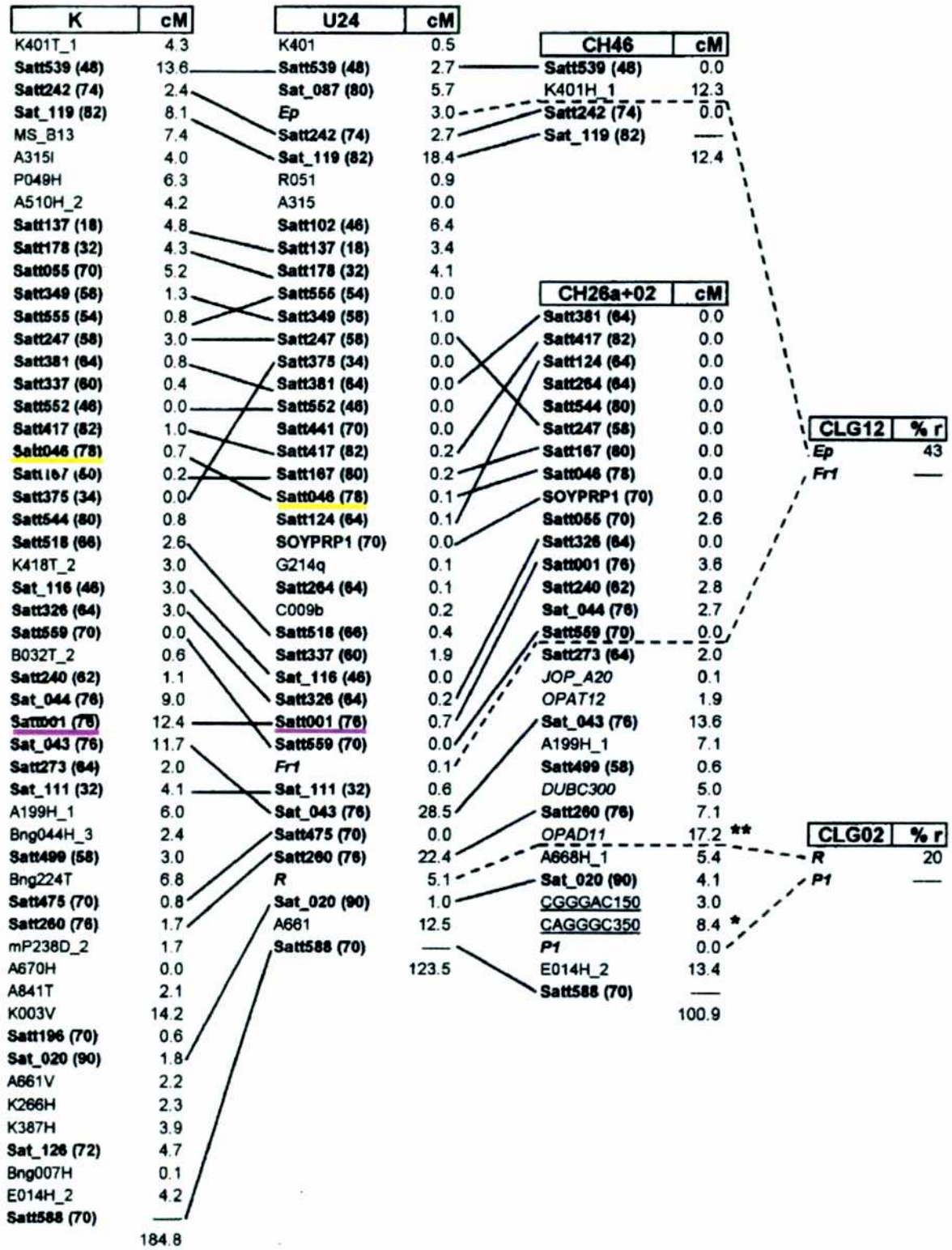
GRUPO DE LIGAMIENTO K/U24

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical



GRUPO DE LIGAMIENTO LU14

USDA Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

L	cM
---	----

BLT010D_2	1.5
A169H	3.0
Sle3_4eD	0.0
Satt446 (48)	2.9
Satt232 (48)	1.8
Satt446 (32)	3.4
R176H	0.8
Satt182 (88)	6.3
Satt238 (18)	0.0
Sat_071 (74)	2.5
Satt398 (48)	1.7
Bng071H	5.4
A264i	0.0
IBH_2	0.7
A450V_2	0.0
A106D	1.8
Satt143 (78)	0.6
Sat_134 (78)	0.0
Satt523 (48)	0.8
Satt278 (48)	0.7
Satt418 (88)	0.7
Satt398 (74)	4.6
B164D	1.9
A023i	1.2
Satt487 (48)	1.6
Satt313 (78)	3.8
Satt284 (98)	1.6
Satt462 (84)	3.4
E014	0.0
BO46i_1	0.9
A071T_5	0.0
A071V_1	2.0
B162T_2	4.4
p28_10V_2	0.0
peG488_1	5.8
Satt481 (48)	0.0
Satt188 (98)	2.7
Sct_010 (88)	3.8
Satt978 (98)	3.4
Satt561 (48)	0.0
Satt527 (68)	1.4
Satt188 (74)	0.9
Satt448 (42)	1.7
gy3E	4.5
A132T_2	5.2
Sat_098 (64)	9.4
G17_3	1.0
A461T	4.9
Satt006 (32)	1.8
A480D	1.2
Satt229 (90)	10.3
Satt373 (68)	0.6
Satt513 (68)	2.1
Bng088T	2.1
A363D_1	0.0
A537D_1	1.7
Bng095i_1	0.0
R201V	0.0
K385V	—

125.2

U14	cM
-----	----

BL007	0.7
BL010	1.2
Satt446 (32)	0.2
Satt232 (48)	2.3
Satt182 (80)	6.8
Satt238 (18)	0.7
Sat_071 (74)	0.0
BL039	9.1
Satt523 (48)	3.1
B124a	0.0
A459	0.0
Satt143 (78)	0.0
Sat_134 (78)	0.6
Satt398 (74)	0.0
Satt418 (88)	0.8
A204	0.9
Satt313 (78)	0.8
Satt284 (98)	0.2
G214i	0.7
G214m	5.2
Satt462 (84)	3.9
L050d	18.0
Satt481 (48)	1.4
Satt188 (98)	15.3
Sat_113 (98)	2.1
Satt527 (98)	0.4
L050e	0.2
Satt981 (48)	5.4
Sat_098 (64)	9.9
G173b	2.6
Dt1	2.6
Satt006 (32)	3.1
A489	6.3
L103b	0.2
K385	5.6
Satt513 (68)	0.4
Satt373 (68)	3.8
A363b	0.0
A802	0.0
B174a	—

112.4

CH09+08	cM
---------	----

Satt486 (48)	15.8
Satt182 (88)	12.9
Sat_071 (74)	6.2
Satt398 (74)	0.0
Satt143 (78)	0.9
Satt278 (48)	0.0
JUBC090	0.5 *
Sat_134 (78)	1.9
Satt487 (48)	15.6
BO46i_1	3.7
Satt462 (84)	2.3
L1	2.2
A071V_1	37.9
Dt1	0.0
A461T_1	0.4
DUBC015	0.0
Satt006 (32)	16.3
Satt373 (68)	22.1
OPAH20	— **

138.9

CLG05	% r
-------	-----

Pgt1	18.0
Pgd1	18.0
L1	37.0
Dt1	—
E3	28.0

GRUPO DE LIGAMIENTO M/U11

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

M	cM
---	----

GMSC514 (58)	2.7
Satt404 (32)	9.7
Satt590 (80)	4.8
Satt201 (58)	3.6
Satt150 (60)	5.0
A351T	10.0
Mng339V	5.2
Satt567 (58)	4.5
Satt540 (80)	4.5
R079H	1.5
Bng222H	11.1
A131T	4.4
Satt463 (78)	6.0
Satt245 (80)	1.3
A946I_2	3.3
Satt323 (58)	1.3
Satt220 (54)	6.4
Bng179T_2	0.0
K417H_3	2.3
Satt536 (54)	0.0
Sat_003 (74)	3.5
Satt175 (78)	3.3
Satt494 (48)	1.2
Sct_147 (42)	4.9
A226H_1	0.0
K024D	0.8
A715V	4.7
Satt306 (54)	3.3
Mng186V	0.7
E043	8.1
K070T	5.0
AC	4.2
Satt551 (66)	4.4
Sat_121 (76)	7.7
Satt250 (48)	4.1
Satt346 (70)	8.3
K227I	2.7
A064T	10.4
A504D	0.0
Mng381T	8.6
Satt336 (66)	—

173.5

U11	cM
-----	----

Satt404 (32)	9.1
Satt590 (80)	7.4
Satt150 (60)	20.6
Satt567 (58)	1.9
Satt435 (56)	0.0
R079	0.0
A060b	6.9
Satt463 (78)	2.8
Satt245 (80)	4.1
A584	0.4
Satt220 (54)	2.1
Satt323 (58)	0.3
L204d	0.0
Satt536 (54)	0.6
Sat_003 (74)	7.1
Satt494 (48)	8.4
Satt306 (54)	14.3
M121	1.1
Satt551 (66)	0.5
BL025	7.8
Sat_121 (76)	1.3
Satt250 (48)	8.3
Satt210 (58)	13.5
Satt336 (66)	2.4
Satt306 (72)	—

116.0

CH40+42	cM
---------	----

Satt590 (80)	14.1
Satt567 (58)	4.8
Satt540 (80)	9.4
DOP_H14	9.4
Satt463 (78)	2.3
Satt245 (80)	4.3
OP_N04	1.6
Sat_003 (74)	0.0
Satt536 (54)	0.2
Satt323 (58)	2.4
Satt175 (78)	26.9 ***
Satt551 (66)	8.1
Sat_121 (76)	10.1
Satt210 (58)	2.3
A064T_1	12.7
Satt306 (72)	—

110.7

GRUPO DE LIGAMIENTO N/U06

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

N	cM
---	----

A071T_6	0.0
AC_telo	0.0
A071T_3	0.0
A071T_10	0.0
A071T_4	7.9
R022	7.6
Satt159 (72)	0.8
Satt152 (82)	0.9
Satt009 (86)	7.8
Satt530 (84)	2.8
K418T_1	0.0
A071T_1	0.6
K395T_2	3.5
i4_2	0.0
A280D	0.0
A426D_2	0.0
Sle_003	0.2
Bng095I_2	1.6
BLT049D_1	0.8
Sle2D_3	0.9
Satt584 (74)	0.9
Satt485 (58)	0.0
Satt393 (66)	2.0
Sat_084 (70)	5.4
Satt125 (48)	11.1
Sat_033 (74)	6.4
Satt387 (64)	4.2
peG488_2	0.0
B162T_1	0.0
L103T	0.8
mO128T	9.0
Satt521 (46)	5.0
Satt549 (50)	4.8
A808V	0.0
BLT015D	3.6
Satt339 (74)	0.0
GMABAB (80)	1.5
Satt237 (70)	5.4
Sat_091 (80)	17.5
Satt257 (58)	5.5
Satt410 (00)	9.7
E049	0.0
K494I_1	3.5
A537D_2	5.3
Bng068V	0.0
A802D	—

137.8

U06	cM
-----	----

L2	23.2
BL004	1.5
Satt159 (72)	0.5
Satt152 (82)	1.0
Satt009 (86)	2.2
Satt530 (84)	0.0
Sat_084 (70)	0.9
A280	0.7
Satt393 (66)	0.0
Satt584 (74)	8.4
Satt080 (34)	4.8
Satt387 (64)	0.0
L103a	0.0
B162	7.5
Rpg4	15.1
Satt521 (46)	4.8
Satt549 (50)	2.3
GMABAB (80)	0.8
Satt339 (74)	0.3
Satt237 (70)	0.0
BL015	1.1
Satt255 (62)	0.0
Sat_091 (80)	3.4
Satt312 (68)	1.7
G214g	0.0
Satt234 (42)	19.5
Satt022 (72)	0.8
Sat_125 (86)	10.1
A455	4.9
A363a	—

115.6

CH22	cM
------	----

Rps7	14.3
OPAC12b	4.1
OP_N03	5.1
Satt152 (82)	1.0
Satt159 (72)	2.2
Satt009 (86)	5.5
OP_U09b	0.0
Satt530 (84)	0.8
A280D_1	1.5
OP_F13	0.0
Satt393 (66)	0.0
Satt125 (48)	0.9
Satt584 (74)	0.0
Satt485 (58)	0.0
Sat_084 (70)	15.9
Sat_033 (74)	4.0
B162T_1	0.0
Satt387 (64)	16.5
GMABAB (80)	9.7
Sat_091 (80)	23.9
Satt257 (58)	8.9
Satt022 (72)	—

114.4

CLG10	% r
-------	-----

L2	27.0
Rps1	—
Rps7	13.0
Rps1	—
Hm	7.0

CLG??

Rpg4	—
------	---

GRUPO DE LIGAMIENTO O/U21

USDA/Iowa St. Univ.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

O	cM	U21	cM	CH56+45/07	cM
Sat_132 (70)	2.4	Satt358 (46)	3.9	Sat_132 (70)	0.0
Satt358 (46)	8.5	Satt487 (70)	0.0	Satt358 (46)	0.0
Satt500 (70)	1.7	Sat_132 (70)	12.4	Satt487 (70)	5.3
Satt492	2.9	Satt445 (78)	20.0	Satt500 (70)	5.4
A081T	7.1	G214c	3.9	Satt445 (78)	27.6 *
G248H_1	0.0	Satt259 (86)	1.2	K265V_2	1.6
Storage_1	10.6	Satt347 (42)	17.9	Satt259 (86)	0.5
A882D	4.5	K011e	2.6	Satt347 (42)	15.8
Satt259 (86)	6.9	Satt262 (82)	0.0	Satt345 (82)	1.8
L185H_2	1.9	Satt473 (58)	0.2	Satt188 (70)	0.0
Bng015V	14.0	Satt128 (18)	0.0	Satt479 (66)	0.9
Satt420 (80)	4.6	BL049b	0.0	Satt173 (82)	0.0
Satt576 (80)	1.6	Satt241 (54)	0.6	Satt262 (82)	0.0
Satt094 (84)	0.8	G214p	0.4	Satt473 (58)	0.0
Satt466 (18)	0.0	Satt585 (48)	0.0	OP_L06	10.7
Satt560	0.9	Satt466 (18)	0.0	DUBC402	2.7
Satt479 (66)	0.0	Satt479 (66)	0.0	Satt563 (56)	13.3
Satt585 (48)	0.8	Satt188 (70)	0.2	Satt477 (58)	15.0
Satt473 (58)	0.0	Satt420 (50)	1.3	SOYLCB (78)	2.8
Satt262 (82)	1.1	Satt173 (82)	12.1	Satt582 (58)	7.2
Mng273D_1	2.0	Satt478 (82)	11.5	Satt581 (48)	17.7
Bng123T	0.8	Satt477 (58)	4.0	E2	18.3
Bng062D	1.4	Satt123 (32)	8.9	Sat_038 (62)	6.5
T003H	3.5	Loph	8.3	Satt153 (50)	1.8
Satt345 (82)	0.0	L204a	30.6	Satt243 (68)	0.5
Satt173 (82)	3.7	Satt243 (68)	6.7	Pgm1	12.4
Satt478 (82)	12.1	BL027	0.4	Sat_108 (76)	1.3
Mng208H	10.0	T010a	0.9	Sat_108 (87)	11.5
mQ117V	0.0	Sat_108 (87)	0.0	M8E6mr2	—
Satt477 (58)	0.8	Sat_109 (76)	9.7		180.8
A878T	15.9	A955b	11.4		
Satt582 (68)	4.5	Scaa001 (18)	—		
Satt581 (48)	2.9		169.5		
Satt331 (18)	1.7				
Bng070I	2.4				
B157T	20.5				
Mng211D	0.8				
Satt153 (50)	0.0				
Sat_038 (62)	1.0				
A102T_2	0.8				
Satt243 (68)	7.8				
T027D	0.0				
BLT027D	1.6				
Sat_108 (87)	0.5				
Mng085D_1	1.3				
Sat_109 (76)	9.4				
A664H_1	—				
	176.1				
Weak Link					
Satt188 (70)	—				

Con respecto a los demás sistemas (el resto de las características morfológicas, RAPD y AFLP) no se utilizó un mapa genético debido a la carencia de información sobre la localización de los *loci*.

La base genética de la soja cultivada es muy estrecha (Delannay, 1983; Hymowitz, 1991), sin embargo tanto el análisis de características morfológicas como los SSR permitieron separar todas las variedades. Lo mismo ocurrió con los marcadores RAPD y AFLP, salvo en el caso de dos variedades, conocidas por estar muy emparentadas que conservan el máximo valor de similitud (1 significa que no fue posible separarlas). Aún en los casos en que se pudo separar a estas dos variedades (caracteres morfológicos y SSR) los datos indican que están altamente emparentadas. Esto indica que cualquiera de los sistemas sería lo suficientemente eficiente para ser utilizado en la separación de las variedades. Sin embargo, para hacer una mejor evaluación de las respectivas eficiencias debemos analizar la congruencia de los datos generados con la evolución o genealogía de las variedades.

Con este fin, las matrices de similitud fueron utilizadas para realizar el “análisis de clusters” o “análisis de agrupamiento”. Para ello se utilizó el sistema de la media aritmética no ponderada, UPGMA (Rohlf, F.J., 1992).

El resultado de éste análisis se representó en forma de diagrama arborescente o dendrograma, mostrando el grado de similitud entre dos variedades o grupos de variedades, para todos los sistemas analizados.

Con el propósito de comprender qué sistema marcador se aproximaba más a la “realidad” genética o genealógica de las variedades, se comparó cada dendrograma obtenido con datos de cada sistema de marcadores moleculares (RAPD, SSR, y AFLP) entre sí. Después se los comparó con el dendrograma obtenido de los datos de características morfológicas y, finalmente, se los validó con los datos de pedigrees.

Primeramente se obtuvieron los coeficientes de correlación existente entre cada sistema utilizando el “Test de correspondencia de matrices de Mantel” (Rohlf F.J., 1992). Al comparar los coeficientes de correlación, el más alto fue entre los marcadores RAPD y SSR ($r = 0.32914$, $p < 0.05$). Al comparar los distintos marcadores moleculares con los datos obtenidos de las características morfológicas, la mayor correlación se observó con los SSR ($r = 0.24687$, $p < 0.05$). Sin embargo, los coeficientes de correlación fueron relativamente bajos, no sólo con respecto a las características morfológicas, sino también entre los distintos sistemas moleculares (SSR, RAPD y AFLP).

Para explicar estos resultados se decidió estudiar primero el agrupamiento de variedades en el dendrograma obtenido con datos morfológicos y luego compararlo con los de los sistemas moleculares.

Con respecto al dendrograma obtenido de las características morfológicas, se observa claramente que aquellas variedades que pertenecen a un mismo grupo de maduración comparten un mismo cluster, pero al comparar con las genealógicas (pedigríes) no se encontró una buena correspondencia con este agrupamiento de las variedades. Si bien este agrupamiento refleja la importancia selectiva de una característica biológica en particular como es el grupo de maduración, indudablemente no refleja la relación o parentesco genético global existente entre las variedades. Este punto tiene explicación biológica dado que los mejoradores suelen introgresar los genes determinantes del grupo de maduración en variedades previamente mejoradas para otras características, creando variedades muy emparentadas para este carácter (y de sus regiones genómicas adyacentes que son “arrastradas” durante el proceso de introgresión por ligamiento con el *locus* seleccionado). Con otro grado de agrupamiento, se observan comportamientos similares para otros caracteres de importancia agronómica. En cambio esto no ocurre con otros caracteres neutros a la selección (por ejemplo color de flor).

Este comportamiento es compatible, además, con el principal objetivo de la utilización de caracteres morfológicos como descriptores, que es la diferenciación de variedades y no el establecer el grado de parentesco entre las mismas.

De la comparación de los árboles de RAPD y AFLP con el morfológico, surge que la distribución de las variedades no concuerda con éste último. Particularmente en el caso de RAPD, las variedades se agrupan más coherentemente con respecto a los datos de pedigríes y se desordenan con respecto a los datos de grupos de maduración.

Estos resultados indican que los RAPD reflejan mejor el grado de parentesco entre variedades que los datos morfológicos, acorde con el hecho de que suelen ser marcadores selectivamente “neutros” y que están, predominantemente localizados sobre secuencias no codificantes de rápida evolución. El tipo de variación evidenciada parece adaptarse muy bien para el seguimiento evolutivo de las variedades por su grado de similitud con los árboles genealógicos. Sin embargo no se puede dejar de mencionar que particularmente los RAPD pueden cometer errores de “muestreo” de número de *loci* genómicos cubiertos por su tendencia a evidenciar “clusters” de bandas ligadas genéticamente por lo que tienden a sobrevalorar la importancia de las regiones cromosómicas mejor representadas en cuanto a bandas polimórficas.

Esto implica que las variedades pueden agruparse sobre la base de su similitud en un grupo de regiones genómicas dadas y no de todo el genoma.

Para solucionar este problema habría que estudiar el grado de independencia de cada uno de los marcadores mediante cruzamientos genéticos *ad hoc* y posterior análisis de segregación. Este problema lo asemeja a lo que ocurre con los caracteres morfológicos en los que el grupo de maduración actúa como factor de agrupamiento, con la diferencia que es poco probable que la región cromosómica mejor representada en RAPD tenga una ventaja selectiva como ocurre con los caracteres morfológicos, por lo que resultan mejores que éstos para estimaciones de distancias genéticas.

En el caso de los AFLP, no hay concordancia con los datos de pedigrí, ni tampoco con los datos de grupo de madurez, indicando que, de los marcadores analizados, son los que peor se adaptan para un adecuado cálculo de distancias genéticas. Es conocido que los AFLP detectan, fundamentalmente mutaciones puntuales cuya dinámica de aparición y posterior conservación durante la evolución de las variedades de soja no es la más adecuada para hacer un seguimiento de este proceso. Otra de las fallas posibles se puede deber a errores de muestreo en la elección de la combinación de “primers”.

Como con pocos ensayos (combinaciones) se obtiene un gran número de marcadores, puede crearse un bias por el tipo de secuencias detectadas. Este efecto puede solucionarse aumentando el número de ensayos para lograr tener información con mayor independencia.

También al igual que en el caso de los RAPD, pueden existir marcadores que se encuentren ligados entre sí y nos estén brindando datos redundantes, por no trabajar con marcadores sin información de su localización en un mapa genético.

Es importante recalcar que ambas tecnologías (RAPD y AFLP) generan una frecuencia de error al momento de computar los datos de bandas, ya que bandas de similar movilidad son consideradas como homólogas y de esta manera se produce una sobre estimación de las similitudes, generando así, agrupamientos erróneos de variedades (Parks *et al*, 1991).

Cuando se compararon los dendrogramas de datos morfológicos con SSR, si bien el coeficiente de correlación entre las respectivas matrices fue relativamente bajo, ambos presentan una buena concordancia con respecto a la agrupación de variedades. En el árbol de datos SSR, no sólo se respetó el ordenamiento de acuerdo a su grupo de maduración (en forma general) sino que también había coherencia en el agrupamiento de las variedades de acuerdo a su

pedigrí y aún más respecto a la empresa que le dio origen. Se pudieron interpretar los trabajos de mejoramiento que realizaron los mejoradores ya que variedades que tenían iguales ancestros de partida, una de las variedades se agrupaba con el grupo perteneciente a un ancestro y la otra variedad con el grupo de su otro ancestro; demostrando que en los programas de mejoramiento se conservó o seleccionó más la información genética de un ancestro con respecto al otro.

De esta manera se observó que los microsatélites logran explicar mucho mejor la evolución genética de las variedades que los otros marcadores moleculares y que el sistema de características morfológicas.

Con la idea de mejorar el sistema se decidió unir todos los datos moleculares y compararlos con los datos de pedigrí. Pero primeramente se realizó una purificación de la MBD (totalidad de marcadores moleculares: SSR, RAPD y AFLP), que tuvieran varios datos faltantes, ya que el programa NTSYS-PC versión 1.8 del “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System”, a pesar de no tener un valor exacto (1=presencia/0=ausencia), los relaciona produciendo distorsiones en la matriz y por ende en los dendrogramas (datos no mostrados).

De esta manera se partió de una MBD combinada y purificada de los distintos tipos de marcadores moleculares (30 SSR, 19 RAPD y 22 AFLP), al obtener la matriz de similitud de la misma y obtener el coeficiente de correlación entre dicha matriz y la morfológica, dio un valor semejante al obtenido de la comparación con SSR. Aún más la observación en el dendrograma prácticamente otorgaba la misma información que el dendrograma de SSR; demostrando de ésta manera, el mayor peso relativo de la información que presentan los microsatélites con respecto a los otros marcadores moleculares (RAPD y AFLP).

Por ésta razón se concluye que, manejando un número suficiente de marcadores que no sea limitante, utilizar los datos de todos los marcadores moleculares combinados o sólo los SSR es exactamente lo mismo.

De acuerdo a todo lo explicado con anterioridad pudimos observar que las características morfológicas representan una información distinta que los SSR. Por esta razón, quisimos observar que pasaba al combinar ambas informaciones en una misma MBD. Así se generó un dendrograma de datos morfológicos + SSR, que refleja un intento de clasificar todas las líneas disponibles en cuanto a su similitud genética, utilizando toda la información posible.

Se presentó una mejoría en cuanto al agrupamiento de las variedades y en el caso de variedades que anteriormente quedaban mal agrupadas de acuerdo a su grupo de maduración y pedigrí, ahora lograron agruparse; **confirmando que ambos sistemas dan informaciones distintas y complementarias.**

Por lo tanto los SSR logran explicar más sobre la composición genética de las variedades, ya que logran realizar un muestreo más exhaustivo del genoma (por su posición conocida en el mapa genético) con marcadores selectivamente neutros, mientras que las características morfológicas explican más sobre el sistema de diferenciación estipulado de acuerdo a características fenotípicas, que en definitiva también son marcadores ya que son el resultado de la expresión genética.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES, CONSECUENCIAS Y PERSPECTIVAS

Se estudió la capacidad comparativa del sistema tradicional basado en descriptores morfológicos, fisiológicos y fenológicos, con los tres sistemas de marcadores moleculares para la diferenciación, estimación de distancias genéticas e interpretación de la evolución de las 100 variedades de soja.

Sobre un total de 424 *loci*, se analizaron al menos 109 *loci* genómicos polimórficos, entre marcadores moleculares y características morfológicas, mostrando un porcentaje global de polimorfismo del 25.7%. Confirmando de esta manera, la baja variabilidad genética relativa de la soja, comparada con otros cultivos y confirmando la estrecha base genética con que se maneja el mejoramiento de estas plantas.

Se demostró que los cuatro sistemas analizados, presentaron diferentes propiedades y que la variabilidad evidenciada por cada uno de los sistemas de marcadores moleculares y características morfológicas, fue diferente. Por esta razón, al combinar los datos de características morfológicas y SSR, se obtuvo la mejor aproximación para la clasificación de todas las líneas posibles tomando en cuanto a su similitud genética y aprovechando la mayor información posible.

El resultado obtenido fue el más cercano a la “realidad” genética (evolutiva) de las plantas, principalmente por comparación con datos de pedigrí.

Este estudio ha demostrado que los cuatro tipos de sistemas analizados presentaron diferentes propiedades:

Los SSR han mostrado el índice más alto de polimorfismo, permitiendo dar informaciones más precisas sobre la variabilidad genética, explicando mucho mejor la evolución genómica de las mismas, ya que la forma de relación de datos es la más congruente con los datos de pedigrí.

Por otro lado, cubrieron las expectativas de muestreo del genoma, ya que la selección de los mismos con el mapa genético permitió tener representados 16 de los 20 grupos de ligamiento existentes en la especie. De esta manera, se ha evitado la duplicación de información producida por marcadores que pudieran estar ligados (redundancia de marcadores), maximizando los resultados con un bajo número de los mismos y utilizando solamente los marcadores más eficientes.

Los AFLP se han caracterizado por un muy alto rango de multiplex, pero bajo polimorfismo, en cambio los RAPD mostraron un valor intermedio de polimorfismo y bajo rango de multiplex.

Los RAPD presentan el inconveniente de la baja reproducibilidad de los resultados entre laboratorios, haciendo de ella una técnica no muy bien vista en el ámbito internacional para trabajos de estandarización de “huellas digitales” genómicas.

Ambas tecnologías (RAPD y AFLP), presentan además el problema de una posible sobre-estimación de datos monomórficos, produciendo ciertos errores en la estimación de las distancias genéticas.

El polimorfismo basado en SSR ha dominado los trabajos de investigación del genoma de mamíferos, demostrando que tienen un positivo impacto sobre la genética de plantas desde el momento que son altamente informativos, es una técnica co-dominante, la cual es compatible con los requerimientos de los trabajos de mejoramiento, programas de genética de poblaciones y estudios de caracterización y diferenciación de variedades.

Con el fin de generar un sistema práctico, confiable y válido en los estudios de caracterización y diferenciación de variedades de soja, la/s técnica/s seleccionada/s deben satisfacer varios criterios (Smith y Chin, 1992):

1. Deben haber demostrado un poder alto de discriminación
2. No deben presentar interacción con el medio ambiente
3. Deben ser capaces de generar resultados equivalentes en diferentes laboratorios
4. Deben permitir el cálculo de distancias entre genotipos que sean consistentes con otros caracteres, como el pedigrí de los genotipos
5. Preferentemente, debe conocerse su localización cromosómica
6. La metodología usada para generar los perfiles de bandas y para traducirlos en identificadores de variedades debe ser de disponibilidad pública
7. Las metodologías seleccionadas deben ser, dentro de lo posible, susceptibles de automatización
8. Deben poseer una relación costo/beneficio adecuada

De acuerdo a todo lo explicado anteriormente la tecnología que mejor cumple con todos los requisitos necesarios para generar un sistema confiable son los marcadores SSR.

Según las recomendaciones suministradas por expertos en el tema, (Smith y Registrar, 1998) los marcadores moleculares, no sólo deben cumplir con los puntos anteriormente estipulados, sino que para obtener un efectivo muestreo del genoma, deberían seleccionarse un marcador por cada brazo de cromosomas que contenga la especie en cuestión.

Si se considera como modelo a la especie maíz que contiene 10 cromosomas, 20 deben ser los *loci* SSR a considerar, uno en cada brazo de cada cromosoma para lograr un eficiente muestreo del mismo y el grado de discriminación debe ser al menos de un 75% (Smith y Registrar, 1998).

Si bien se concluye que la técnica recomendada para estos estudios son los marcadores SSR, se puede postular la siguiente hipótesis para su utilización, no sólo en la identificación de variedades (obtención de la “huella digital” genética de material ya protegido), sino también para la diferenciación (registro de nuevas variedades) en el cuadro de registración y protección de las mismas:

De acuerdo a los resultados obtenidos con las matrices de similitud creadas por los datos de las características morfológicas y SSR, se observó que dos variedades (“A5308” y “OFPEC Santafesina”) por la utilización de las 8 características morfológicas estudiadas por el INASE resultaron ser iguales.

Pero realizando estudios aún más profundos, se logró encontrar que la única diferencia morfológica que presentaban ambas variedades, era el momento de inicio de la etapa de reproducción R1 de las mismas (apertura de las flores).

De las 100 variedades analizadas de acuerdo a las informaciones suministradas por especialistas (Registro de Cultivares, INASE) en la diferenciación y caracterización de variedades por características morfológicas, las mismas podrían ser consideradas como las más semejantes entre sí.

Concordando con los resultados morfológicos vistos a campo, se observó que en ambos dendrogramas ya sea por marcadores SSR como el obtenido de datos de características morfológicas, se obtiene la misma distancia genética entre las variedades en cuestión, con un valor de similitud de 0.80.

De esta manera la similitud existente entre estas dos variedades, podría estar marcando un límite máximo aceptable de distancia genética para la inscripción de una nueva variedad (en soja). Este caso de comparación de “A 5308” y “OFPEC Santafesina” sería un ejemplo de variedades “esencialmente derivadas”, según los datos de similitud genética obtenidos de las características morfológicas sumados a SSR y corroborados con datos de pedigrí.

De acuerdo a estos datos y a lo explicado con anterioridad proponemos:

Con la utilización de los 30 *loci* SSR, para un estudio de diferenciación sólo por marcadores moleculares, aquellas nuevas variedades que se encuentren por encima del valor de similitud de 0.80, se consideren como iguales (o “esencialmente derivadas”) y por debajo de este valor las variedades sean consideradas “**novedosas**”.

Si bien somos conscientes que no sólo es necesario, para diferenciar una variedad, que sea “novedosa”, en futuros programas de investigación, se propone utilizar estos 30 *loci* SSR, para ver el comportamiento de un número de 20 plantas de una misma variedad, con el fin de estipular cual sería el valor de tolerancia para que una variedad de soja sea considerada “**homogénea**”.

La otra característica que una variedad debe cumplir para obtener una propiedad es la de ser “**estable**”, para ello se propone el control del material una vez por año, solicitando a las empresas muestras de semillas de la respectiva variedad a controlar. En un laboratorio de marcadores moleculares en el tiempo de días se puede chequear que esa variedad sigue conservando el mismo patrón que su muestra original, a la cual se le otorgó propiedad.

Como resultado final de esta tesis, se logró establecer la “huella digital genética” para cada variedad y se realizó un estudio de variabilidad genética, estipulando la distancia mínima a considerar para la obtención de propiedad de variedades, sólo por marcadores moleculares.

Estos resultados brindarán un adecuado respaldo al sistema de protección de variedades y alentarán a la inversión privada en el desarrollo de nuevos y mejores cultivares para nuestro país, en particular en un cultivo estratégico como la soja.

La caracterización molecular permitirá además controlar la uniformidad y estabilidad de los mismos durante sucesivos ciclos de multiplicación, verificar su pedigrí y grado de homocigosis, establecer grados de relación genética entre materiales (variedades “esencialmente derivadas”) y realizar un control de calidad genotípica, detectar duplicaciones en los bancos de germoplasma del país y facilitar la selección de parentales para cruzamientos en los planes de mejoramiento.

Por otro lado, se podrán iniciar trabajos de investigación buscando si algunos de estos *loci* SSR, se encuentran ligados a una característica morfológica de interés agronómico para los mejoradores.

REFERENCIAS

- Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A.; Cregan, P.B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- Akkaya, M.S.; Shoemaker, R.C.; Specht, J.E.; Bhagwat, A.A.; Cregan, P.B. (1995). Integration of simple sequence repeat (SSR) DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* 35:1439-1445.
- Barry, G.; Kishore, G.; Padgett, S.; Taylor, M.; Kolacz, K.; Weldon, M.; Re, D.; Eichholtz, D.; Fincher, K.; Hallas, L. (1992). Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. B. K. Singh, H. Flores and J. C. Shanon, eds. American Society of Plant Physiologists. Madison. Wisconsin. EUA. Pag. 139-145.
- Beckmann, J.S. y Soller, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/technology* 8: 930-932.
- Bernard, R.L. (1967). The inheritance of pod color in soybean. *J. Hered.* 58:165-168.
- Bernard, R.L. (1971). Two major genes for time of flowering and maturity in soybeans. *Crop. Sci.* 11:242-244.

- Bernard, R.L. (1972). Two genes affecting stem termination in soybeans. *Crop. Sci.* 12:235-239.
- Bernard, R.L. y Weiss, M.G. (1973). Qualitative genetics. Soybeans: improvement, production and uses. B.E. Caldwell, ed. Am. Soc. of Agron. Madison. Wisconsin. EUA. Pag. 117-154.
- Boernma, H.R. y Jones, B.G. (1978). Inheritance of a second gene for brachytic stem in soybeans. *Crop. Sci.* 18:559-560.
- Bolsa de Cereales (1964, 1969, 1971, 1975, 1985, 1991, 1994/95 y 1995/96) Revista Bolsa de Cereales. Buenos Aires. Argentina.
- Bolsa de Cereales (1971). Importancia de la soja a nivel mundial. Revista Bolsa de Cereales. Número Estadístico 1971: 163:166.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnik, M.; Davis, R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Broun, P. y Tanksley, S.D. (1996). Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol Gen Genet* 250:39-49.
- Brunel, D.A. (1994). Microsatellite markers in *Helianthus annuus* L. *Plant and Molecular Biology* 24: 397-400.

- Bunge, M. (1969). La investigación científica. Ediciones Ariel, Barcelona, 955 págs.
- Burton, J.W. (1987). Quantitative genetics: results relevant to soybean breeding. Soybean: improvement, production and uses. J.R. Wilcox, ed. Am. Soc. of Agron. Madison. Wisconsin. EUA. Pag. 211-242.
- Buttery, B.R. y Buzzel, R.I. (1968). Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. Crop. Sci. 8:723-725.
- Buttery, B.R. y Buzzel, R.I. (1973). Inheritance of flavonol glycosides in soybeans. Can. J. Genet. Cytol. 16:897-899.
- Buzzel, R.I. y Voldeng, H.D. (1980). Inheritance of insensitivity to long daylength. Soybean Genet. Newsl. 7:26-29.
- Clifford, H.T. y Stephenson, W. (1975). An Introduction to Numerical Classification, Academic Press, Nueva York, 229 págs.
- Crisci, J.V. y López Armengol, MF. (1983). Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C., 132 págs.

- Cohen, M. y Nagel, E. (1971). Introducción a la lógica y al método científico. Amorrortu Editores, Buenos Aires, Tomo I, 268 págs., Tomo II, 284 págs.
- Delanney, X.; Rodgers, D.M.; Palmer, R.G. (1983). Relative Genetic Contribution Among Ancestral Lines to North American Soybean Cultivars. Crop Sci 23: 944-949.
- Devos (1995). Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theoretican and Applied Genetics 90 (2) 247-251.
- Dzikowski, B. (1936). Studia nad soja *Glycine hispida* (Moench) Maxim. Cz. 1. Morfologia. Pamietnik Panstwowego Instytutu Naukowego Gospordarstwa Wiejskiego w Pulawach. Tom XVI. Zeszyt 2. Rosprawa Nr. 253:69-100.
- Easteal, S.; McLeod, N.; Reed, K. (1991). DNA profiling, principles, pitfallls and potential. A Handbook of DNA-based evidence for the legal, forensic and law enforcement professions. Harwood Academic Publishers. 227pp.
- Fundação CARGILL (1983). Origem da especie, introdução e disseminação no Brasil. Soja. Planta, clima, pragas, molestias e invasoras. Vol 1.: 3-10.

- Giorda, L. y Baigorri, H. (1997). El cultivo de la soja en Argentina. INTA. Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez-EEA Manfredi. Coordinación Subprograma Soja. Pags.448.
- Hayashi, M.; Yanagisawa, T.; Harada, K.; Akihama, T. (1993). Simple repetitive DNA sequences in the soybean (*Glycine max.*) genome. Jpn. J. Breed. 43: 449-453.
- Handboobk of Variety Testing. (1993). Growth chamber-greenhouse testing procedures: Variety identification. The International Seed Testing Association, ISTA.
- Hymowitz, T. y Singh, R.J. (1988). Update information on biosystematics of the genus *Glycine*. Soybean Genetics Newsletter 20:104-106.
- Hymowitz, T. y Bernard, R.L. (1991). Origen of the Soybean and Germplasm Introduction and Development in North America in *Use of Plant Introductions in Cultivar Development*, Part 1, CSSA Special Publication n° 17 pp. 147-164. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Irazoqui, H.A. e Isla, M.A. (1996) Porqué una oleo-química de base agrícola?. Aceite y Grasas 23:156-166.

- Johnson, H.W. y Bernard, R.I. (1963). Soybean genetic and breeding. The soybean. Norman, A.G., ed. Academic Press, Inc. New York. EUA. Pag. 102-106.
- Keim, P.; Beavis, W.; Schupp, J.; Freestone, R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. Theor Appl Genet 85: 205-212.
- Kilen, T.C. y Hartwing, E.E. (1975). Short internode character in soybeans. Crop Sci. 11:559-561.
- Kilen, T.C. y Hartwing, E.E. (1977). Evaluation of early generation soybeans for resistance to soybean looper. Crop Sci. 17:397-398.
- Lee, D.; Reeves, J.C.; Cooke, R.J. (1996). DNA profiling and plant variety registration: 1. The use of random amplified DNA polymorphisms to discriminate between varieties of oilseed rape. Electrophoresis (17): 261-265.
- Lodhi, M.A.; Ye, G-N; Weeden, N.F., y Reisch, I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *vitis* species. Plant Molecular Biology 12: 6-13.
- Maggio, A.G.; Berra, G; Finster, L. (1996). La proteína de soja en la alimentación del ternero lactante. Revista Oleaginosos 5 (15): 11-16.

- Maughan, P.J.; Saghai Maroof, M.A.; Buss, G.R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, 38: 715-723.
- Milbourne, D.; Meyer, R.; Bradshaw, J.E.; Baird, E.; Bonar, N.; Powel, J.W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, M.; Tingey, S.; Rafalsky, A. (1997). The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed.* 3: 225-238.
- Morgante, M. y Olivieri, A.M. (1993), PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Multani, D.S. y Lyon, B.R. (1995). Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. *Genome* (38): 1005-1008.
- Murphy, P.A. (1985). Structural characteristics of soybean Glycinin and bconglycinin. Protein chemistry. Proceeding of World Soybean Research Conference III. Shibles, r., ed. Ames. Iowa. EUA. Pag. 143-151.
- Nozzolillo, C. (1973). A survey of anthocyanin pigments in seedling legumes. *Can. J. Bot.* 51: 911-915.

- Olivier, J.F. (1996). La vida natural. Parte I: Materias grasas. Lípidos. Aceites y grasas 22:45-55.
- Owen, F.V. (1927). Inheritance studies in soybeans. II. Glabrousness, color of pubescence, time of maturity and linkage realations. Genetics 12:519-529.
- Palmer, R.G. y Kilen, T.C. (1987). Qualitative genetics and cytogenetics. Soybeans: improvement, production and uses. J.R. Wilcox, ed. Am. Soc. of Agron. Madison. Wisconsin. EUA. Pag. 135-197.
- Parks, C.; Chang, L.S.; Shenk, T. (1991). A polymerase chain reaction mediated by a single primer: cloning of genomic sequence adjacent to a serotonin receptor protein coding region. Nucleic Acids Res 19: 7155-7160.
- Piquín, A. (1968). Soja: cultivo del futuro argentino. Revista Bolsa de Cereales 2811: 38-43.
- Probst, A.H. y Judd, R.W. (1973). Origin, U.S. history and development and world distribution. Soybeans: improvement, production and uses. B.E. Caldwell, ed. Am. Soc. of Agron. Madison. Wisconsin. EUA. Pag 1-15

- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, Ch.; Hanafey, M.; Vogel, J., Tingey, S. y Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Rode, M.W. y Bernard, R.L. (1975). Inheritance of bullate leaf. *Soybean Genet. Newsl.* 2:44-46.
- Roder, M.S.; Plaschke, J.; Konig, S.U.; Borner, A.; Sorrels, M.E.; Tanksley, S.D.; Ganai, M.W. (1995). Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics.* 246 (3): 327-333.
- Rohlf, F.J. (1992). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and multivariate analysis system version 1.7. Owner manual.
- Rongwen, J.; Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A., Lavi, U.; Cregan, P.B. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. And Applied Genet* 90 (1): 43-48.
- Saghai-Maroo, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen, R.A. y Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley. Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:8014-8018.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schötterer, C. y Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 211-215.
- Senior, M.L. y Heun, M. (1993). Mapping maize microsatellite and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Singh, R.J. y Hymowitz, T. (1985). The genomic relationships among six wild perennial species of genus *Glycine*, subgenus *Glycine* Willd. *Theoretical and Applied Genetics* 71:221-230.
- Singh, R.J.; Kollipara, K.P.; Hymowitz, T. (1994). Intergenomic relationship among wild perennial *Glycine* species. *In: Proceeding (0015) of the World Soybean Research Conference V. Chiang Mai. Thailand.*
- Smith, S. y Chin, E. (1992). Pioneer Hi-Bred International. Application of RAPD Technology to Plant Breeding (46-49). Joint Plant Breeding Symposia. Minneapolis, Minnesota, EUA.

- Smith, S. y Registrar, J. (1998). Genetic Purity and Testing Technologies. DNA-based methodologies replace biochemistry. PROPHYTA, ISTA Congress OECD, Pretorio, South Africa. Pags: 50-53.
- Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973). Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Clasiffication, Freeman, San Francisco, CA., XV, 573 págs.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1962). The Comparison of Dendograms by Objetive Methods. Num. 11:33.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1970). Introducción a la Bioestadística. State University of New York at Stony Brook. Editorial Reverté, S.A., Buenos Aires, 362 págs.
- Tang, W.T. y Tai, G. (1962). Studies on the qualitative and quantitative inheritance of an interspecific cross of soybean, *Glycine max* X *Glycine formosana*. Bot. Bull. Acad. Sin. 3:39-60.
- Tanksley, D.S y Broun, P. (1996). Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in tomato genome. Mol Gen Genet 250: 39-49.

- Takahashi, Y. y Fukuyama, J. (1919). Morphological and genetics studies on the soybean. Hokkaido Agric. Exp. Stn. Rep. 10.
- Tautz, D. y Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12: 4127-4138.
- Tautz, D.; Trick, M.; Dover, G.A. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- UPOV/BMT/4/21, (1997). Draft Report, prepared by the Officer of the Union. Fourth Session, Cambridge, United Kingdom.
- UPOV/QUI/96/13, (1996). La utilización de técnicas bioquímicas y de Biología molecular en los exámenes DHE.
- UPOV/QUI/96/15, (1996). La noción de variedad esencialmente derivada.
- UPOV/TG/1/2, (1979). Revised General Introduction to the Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability of new varieties of plants
- UPOV/TG/80/3, (1983). Guidelines for the Conduct of Test for Distinctness, Homogeneity and Stability, Soybean (*Glycine max* (L) Merrill).

- Voss, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.;
Hornes, M.; Frijters, A., Pot, J.; Peleman, J; Kuiper, M.;
Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA
fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, N°. 21: 4470-
4414.
- Walker, M. (1968). *El pensamiento científico*. Editorial Grijalvo,
México, 196 págs.
- Welsh, J. y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using
PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A., Tingey,
S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary
primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*
18:6331-6335
- Woodworth, C.M., (1932). Genetics and Breeding in the
improvement of the soybean. *Bull. Agrc. Exp. Stn. (III)*
384:297-404.
- Woodworth, C.M. (1933). Genetics of the soybean. *J. Am. Soc.*
*Agron.*25:36-51.

- Yanagisawa, T.; Hayashi, M.; Hirai, A.; Harada, K., (1994). DNA fingerprinting in soybean (*Glycine max.* (L.) Merrill) with oligonucleotide probes for simple repetitive sequences. *Euphytica* 80: 129-136.
- Zabeau, M. y Voss, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7
- Zeni, E.R. (1971). El cultivo sagrado. *Revista Bolsa de Cereales* 2845: 3-7.