



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

**Mapeo molecular de QTLs asociados a la respuesta al
Síndrome de la Muerte Súbita (*Fusarium tucumaniae*) en
soja [*Glycine max* (L.) Merr.]**

Clarisa Noelia Bernardi

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGISTER EN
GENÉTICA VEGETAL**

Director: Dr. Javier Ramón Gilli.

Co - Director: Ms. Lisandro Germán Lenzi.

Año 2017

Mapeo molecular de QTLs asociados a la respuesta al
Síndrome de la Muerte Súbita (*Fusarium tucumaniae*) en soja
[*Glycine max (L.) Merr.*].

Clarisa Noelia Bernardi

Licenciada en Genética
Universidad Nacional de Misiones

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en INTA Marcos Juárez, durante el período comprendido entre los años 2014 – 2017, bajo la dirección del Dr. Javier R. Gilli y co – dirección del Ms. Lisandro G. Lenzi.

Clarisa Noelia Bernardi

Javier Ramón Gilli

Lisandro Germán Lenzi

Defendida:

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mi director de tesis Dr. Javier Gilli por brindarme sus conocimientos, ayudarme, formarme y dedicarme su tiempo para la realización de este trabajo.
- ✓ A mi codirector de tesis Ms. Lisandro Lenzi por acompañarme, enseñarme y brindarme sus conocimientos sobre el “mundo de la muerte súbita”.
- ✓ Al Dr. Leonardo Vanzetti por su predisposición, por brindarme sus conocimientos, su apoyo y sobre todo su amistad.
- ✓ A la Lic. Belén Conde por guiarme y brindarme sus conocimientos.
- ✓ A la Ing. Beatriz Formica por acompañarme en todo momento.
- ✓ A todos los integrantes de la Sección Soja de la Experimental por dejarme ser parte de este grupo.
- ✓ A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología por su apoyo, por el tiempo compartido día a día, y lo más importante, su amistad.
- ✓ A mis compañeros de la maestría con los que compartí momentos lindos a lo largo del cursado, en especial a mi amiga Vicky.
- ✓ A mi amiga Romi y a su familia, en especial a mi ahijado Agustín.
- ✓ A mi mamá y mi papá por sus consejos, su amor, preocupación y confianza en mí en todo momento.
- ✓ A mi hermano, por estar siempre presente.
- ✓ A mi amor Maxi por ser incondicional y acompañarme en todo momento, a su familia y a nuestro bebé, que viene en camino.

A mi familia

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Situación actual del cultivo de soja	1
2. Agentes causales de Síndrome de la Muerte Súbita	1
3. Síntomas de la enfermedad	2
4. Manejo de la enfermedad	3
4.1 Tipos de resistencia	4
4.1.1 Resistencia vertical	4
4.1.2 Resistencia horizontal	4
5. Mapeo	6
5.1 Mapas Genéticos	6
5.1.1 Grupos de ligamiento	7
6. Mapas de QTLs	7
6.1 Diseño básico de una población biparental de mapeo	7
6.2 Marcadores Genéticos en el análisis de QTL	8
6.2.1 Secuencias simples repetidas	9
6.2.2 Polimorfismos en un único nucleótido	10
6.3 Diseño del Mapa Genético	10
6.4 Evaluación fenotípica de la población de mapeo	11
6.5 Métodos de detección de QTLs	11
6.5.1 Análisis de Marcador Individual	12
6.5.2 Mapeo por Intervalo Simple	12
6.5.3 Mapeo por Intervalo Compuesto	13
6.6 Potencia y precisión del mapeo de QTL	13
6.7 QTLs asociados a resistencia al SMS	13
7. Componentes de la Varianza	16
7.1 Heredabilidad	16
OBJETIVOS HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Material vegetal	19
2. Caracterización fenotípica	19
2.1 Experimentos a campo	19
2.2 Prep. Inóculo para inoc. artificial	20
2.3 Diseño experimental	20
2.4 Caracteres fenotípicos evaluados	20
3. Caracterización Molecular	22
3.1 Extracción de ADN	22
3.2 Marcadores Moleculares	23
3.2.1 SSRs	23
3.2.2 SNPs	25
4. Análisis Estadístico	26
4.1 Caracterización Fenotípica	26
4.2 Caracterización Molecular	27
RESULTADOS	28
1. Caracterización fenotípica	28
1.1 Análisis de parentales	29
1.2 Análisis de RILs	30

1.3 Componentes de varianza	34
2. Caracterización molecular	35
2.1 Regiones candidatas	35
2.2 Resto del genoma	41
3. Segregación de los SSRs en la población de RILs	51
4. Análisis de Marcador Individual	52
4.1 Regiones candidatas	52
4.2 Resto del genoma	52
DISCUSIÓN	54
1. Caracterización fenotípica	54
1.1 Análisis de parentales	54
1.2 Análisis de RILs	55
1.3 Componentes de varianza	57
2. Caracterización molecular	57
2.1 Regiones candidatas	58
2.2 Resto del genoma	59
2.3 Análisis de marcador individual	59
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ABREVIATURAS

- SMS** Síndrome de la Muerte Súbita
cM centiMorgan
GL Grupo de Ligamiento
RIL Línea Recombinante Endocriada
MM Marcador Molecular
SSR Secuencia Simple Repetida
SNP Polimorfismo de un Único Nucleótido
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
pb par de bases
SAM Mejoramiento Asistido por Marcadores
ANOVA Análisis de la Varianza
SIM Mapeo por Intervalo Simple
CIM Mapeo por Intervalo Compuesto
H² Heredabilidad en Sentido Amplio
h² Heredabilidad en Sentido Estricto
GM Grupo de Madurez
gr gramo
μl microlitro
ml mililitro
M molar
ng nanogramo
μM micromolar
IE Índice de Enfermedad
R² Coeficiente de Determinación

RESUMEN

El Síndrome de la Muerte Súbita (SMS) es una enfermedad que afecta el cultivo de soja en Argentina, es causado por cuatro especies de *Fusarium* habitantes del suelo, con predominio en Argentina de *Fusarium tucumaniae*. La expresión de la resistencia a SMS está gobernada por varios genes y ningún genotipo expresa resistencia total a la enfermedad. Fueron confirmados 14 QTLs localizados en los grupos de ligamiento (GL) C2, G, I, D2, N, F y H, que confieren resistencia a la enfermedad en hoja y raíz. En este trabajo se propuso identificar marcadores moleculares (MM) asociados a la respuesta fenotípica frente a *F. tucumaniae* en condiciones de campo en una población de RILs proveniente del cruzamiento biparental de NA4613RG y ADM4800. Para determinar la respuesta fenotípica de 149 RILs F2:F9 y de sus parentales durante cuatro campañas agrícolas, se evaluó la incidencia y severidad de cada parcela y se construyó el índice de la enfermedad (IE); además se analizaron 221 MM en 20 GL y mediante un ANOVA se determinó asociación entre MM e IE. El rango de variación del carácter IE para las cuatro campañas analizadas fue entre 0,00 y 20,00 para el parental parcialmente resistente ADM4800 y el parental susceptible NA4613RG, respectivamente. La población de RILs expresó valores de IE dentro de este rango, además las medias de la población fueron estables, excepto en una sola campaña. Mediante el estudio de la interacción significativa RILs * Campaña, se encontraron ocho RILs que fueron estables y presentaron un IE promedio inferior al IE promedio de ADM4800, las cuales aportaron mayor variabilidad al IE, incrementando el rango de selección para el mejoramiento genético y aportando nuevas combinaciones de genes para mapeo. Considerando la variabilidad de IE detectada, se concluyó que este carácter podría ser incorporado a genotipos susceptibles en programas de mejoramiento. Veinticinco MM fueron polimórficos entre los parentales de la población, de los cuales 13 se localizaron en las regiones previamente caracterizadas por expresar resistencia al SMS y 12 en el resto del genoma. Finalmente, nueve SSRs resultaron asociados al IE en esta población, seis de las regiones asociadas al IE coincidieron con QTLs mapeados en otras fuentes de resistencia, pero caracterizados por la resistencia a SMS causado por *F. virguliforme*, mientras que, los hallados en este estudio aportaron resistencia contra *F. tucumaniae*.

ABSTRACT

Molecular mapping of QTLs associated with the response to Sudden Death Syndrome (*Fusarium tucumaniae*) in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.].

The Sudden Death Syndrome (SDS) is caused by four species of *Fusarium* that inhabit the soil, being the *Fusarium tucumaniae* the one that predominates in Argentina. Fourteen QTLs were confirmed and localized in the linkage groups (LG) C2, G, I, D2, N, F y H, that provide disease resistance in leaves and roots. On this project it has been proposed to identify molecular markers (MM) associated to the phenotypic response against *Fusarium tucumaniae* in farm conditions, on a population of RILs derived from the crossing NA4613RG by ADM4800. To determine the phenotypic response of 149 RILs and their parents during four years, the incidence and the severity of each plot were evaluated and the disease index (DI) was determined, 221 MM in 20 LG were also analyzed and the association between MM and DI was determined through ANOVA. Twenty-five MM were polymorphic between the parents of the population, from which nine turned out to be associated to the DI. Six of the MM coincide with the QTLs mapped in other resistance sources, but characterized by the resistance to SDS caused by *F. virguliforme*, whereas, the ones found in this research provide resistance to *F. tucumaniae*.

INTRODUCCIÓN

1. Situación actual del cultivo de soja

La soja [*Glycine max (L.) Merr.*] es una planta anual perteneciente a la familia de las leguminosas, que presenta características fisiológicas que la diferencian del resto de los cultivos más difundidos a nivel nacional y mundial, como la respuesta al fotoperiodo, la plasticidad adaptativa y la producción de semillas con elevados contenidos de proteína y aceite, lo cual hace a este cultivo muy importante para la economía regional (Giorda, 1997).

En Argentina, la soja ocupa una superficie de 19,6 millones de hectáreas (ha), con un rendimiento promedio anual de 29,1 quintales (qq), y una estimación de producción para la campaña 2016 / 2017 de 55,3 millones de toneladas (Tn) (USDA, 2016).

Uno de los factores más importantes que limita la producción de este cultivo es la incidencia de enfermedades, que viene en incremento posiblemente por la falta de rotación con otros cultivos y las condiciones ambientales favorables.

El cultivo de soja durante la campaña agrícola 2015 – 2016 fue muy afectado por condiciones ambientales desfavorables. Lluvias frecuentes y abundantes durante los meses de noviembre y diciembre, elevadas temperaturas y escasas lluvias durante el mes de enero y nuevamente abundantes precipitaciones durante febrero y abril ocasionaron la aparición y el incremento de patógenos como *Phytophthora sojae*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Septoria glycines*, *Macrophomina phaseolina* y *Cercospora kikuchii* causantes de enfermedades como podredumbre de raíz y tallo, mancha marrón, podredumbre carbonosa, tizón foliar, etc. (Distéfano et al., 2016).

2. Agentes causales de Síndrome de la Muerte Súbita

Una de las enfermedades que ha sido priorizada para su estudio en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) durante los últimos 15 años fue el Síndrome de la Muerte Súbita (SMS), cuyo agente causal fue identificado originalmente en Arkansas (EE. UU) en el año 1971 como un hongo de suelo denominado *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, mientras que, en Argentina se detectó por primera vez en la región pampeana norte, durante la campaña 1991/1992 (Ivancovich et al., 1992) y en el noroeste argentino (NOA) en la

campana siguiente (Ploper, 1993). Además, fue identificada en otros países productores de soja como Brasil (Nakajima et al., 1993; 1996) y Paraguay (Yorinori, 2002). A nivel mundial estudios filogenéticos moleculares, juntamente con estudios morfológicos y patogénicos realizados desde el año 2003 demostraron que el SMS es causado por cuatro especies de *Fusarium* habitantes del suelo, muy relacionadas entre sí (*F. virguliforme* O'Donnell y T. Aoki, *F. tucumaniae* T. Aoki, O'Donnell, Yos. Homma y Lattanzi, *F. brasiliense* T. Aoki y O'Donnell y *Fusarium crassispitatum* Scandiani, T. Aoki y O'Donnell, sp. nov.) (Aoki et al., 2005).

En Argentina se observaron las cuatro especies del hongo, con predominio de *F. tucumaniae*, seguido por *F. virguliforme*, siendo esta última la única especie presente en EE. UU (Scandiani et al., 2004; O'Donnell et al., 2010; Aoki et al., 2012). En el año 2006 se demostró la ocurrencia de la forma sexual (peritecios) de *F. tucumaniae* mediante cruzamientos en condiciones de laboratorio (Covert et al., 2007) y en 2010 se la encontró en la naturaleza, cerca de Pergamino, en Fontezuela (Scandiani et al., 2011).

En un relevamiento realizado en el área de Marcos Juárez, en la campana 2005/2006 se observó que la incidencia de la enfermedad varió entre 1 y 20% (Distéfano y Gadbán, 2006), con un 14% de disminución del rendimiento en un lote comercial y hasta un 41,9% en parcelas inoculadas versus sin inocular (Lenzi et al., 2007).

3. Síntomas de la enfermedad

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en las raíces, en etapas vegetativas y consisten en una necrosis a causa de las toxinas que produce el hongo en las raíces. La raíz principal y la parte inferior del tallo sufren una decoloración vascular y la médula toma un color blanco. Bajo ciertas condiciones, el hongo esporula en las raíces, formando esporodoquios que producen masas de conidios y se visualizan de color azul (Hartman et al., 2015).

La fase visual de la enfermedad ocurre cuando los síntomas foliares son observados a campo en estadios reproductivos, después de floración. En las hojas aparecen manchas cloróticas internervales que se expanden y se vuelven necróticas. Los foliolos muy afectados se desprenden de los peciolo y éstos permanecen unidos al tallo (Figura 1). Una infección severa produce el aborto de flores y vainas y reduce el peso de las semillas (Hartman et al.,

2015). Las plantas pueden morir prematuramente en forma aislada, en grupos o distribuidas por todo el lote de producción debido principalmente a la distribución desuniforme del hongo por todo el terreno (Roy et al., 1997; Scandiani et al., 2012).

Las disminuciones del rendimiento dependen de varios factores, entre ellos, el cultivar utilizado, el ambiente, condiciones edáficas y el estadio de desarrollo de la planta al momento de la infección. Si ésta se presenta en estadios reproductivos tempranos puede producir aborto de flores y vainas, mientras que, en estadios más tardíos puede causar la disminución del número y peso de granos (Roy et al., 1997; Scandiani et al., 2012).



Figura 1: Síntomas foliares causados por el Síndrome de la Muerte Súbita.

4. Manejo de la enfermedad

Debido a que la infección se produce en el sistema radicular, el tratamiento convencional con fungicidas foliares no ha dado resultado para el control de esta enfermedad, además se han probado tratamientos de semillas con diferentes productos como así también tratamiento en el surco de siembra, pero el control es muy limitado. En este sentido, varias

prácticas de manejo pueden reducir el riesgo de daño por el SMS, aunque ninguna de ellas puede prevenir la enfermedad, siendo la estrategia más efectiva la utilización de cultivares parcialmente resistentes (Westphal et al., 2008).

4.1 Tipos de Resistencia

La resistencia a las enfermedades que es controlada genéticamente por la presencia de uno, varios o muchos genes para resistencia en la planta contra el ataque del patógeno se conoce como resistencia verdadera. En este tipo de resistencia, el hospedante y el patógeno son más o menos incompatibles entre sí debido a la falta de reconocimiento químico entre ellos, o porque la planta hospedante se defiende a sí misma del patógeno mediante los diferentes mecanismos de defensa que ya tiene, o que son activados en respuesta a la infección por el patógeno.

Existen dos tipos de resistencia verdadera: vertical y horizontal (Agrios, 2005).

4.1.1 Resistencia Vertical

También llamada resistencia específica, cualitativa o diferencial. Este tipo de resistencia es efectiva contra ciertas razas del patógeno y susceptible frente a otras, lo que permite diferenciar entre las razas del patógeno. Se basa en un sólo gen mayor o en una combinación de ellos que controlan una etapa importante de la interacción que se establece entre el patógeno y la planta hospedante. En presencia de resistencia vertical, el hospedante y el patógeno al parecer son incompatibles y el primero generalmente responde desarrollando una reacción de hipersensibilidad y, de esta manera, el patógeno no puede establecerse ni multiplicarse en la planta hospedante (Agrios, 2005).

Este tipo de resistencia desaparece con la variación del patógeno y es de tipo no durable, ya que no es efectiva cuando se utiliza durante muchos años en un área determinada (Ribeiro Do Vale et al., 2001).

4.1.2 Resistencia Horizontal

También llamada resistencia raza no específica, durable, de planta adulta y de patogenia lenta. Es de naturaleza poligénica, se basa en la interacción de genes de efecto pequeño y de acción génica aditiva, al parecer controlan las diversas etapas de los procesos fisiológicos de la planta, que generan las sustancias y estructuras que constituyen sus

mecanismos de defensa. La combinación de genes reduce el progreso de la enfermedad a niveles tan bajos que sólo se pueden observar cuando la presión de la enfermedad es alta (Ribeiro Do Vale et al., 2001).

En general, la resistencia horizontal no evita que las plantas sean infectadas, sino que retarda el desarrollo de cada uno de los loci de infección en la planta y, por lo tanto, retrasa la propagación de la enfermedad y el desarrollo de epifitias en el campo. Existe cierto grado de resistencia horizontal en las plantas sin importar si está presente o no la resistencia vertical (Agrios, 2005).

Se ha demostrado que la expresión de la resistencia a SMS en soja está gobernada por varios genes y que ningún genotipo expresa resistencia total a esta enfermedad (Njiti et al., 2001), lo cual limita la heredabilidad del carácter haciendo complejo el mejoramiento genético, debido principalmente a la interacción con las condiciones ambientales como temperatura, textura del suelo, precipitaciones, fertilidad del suelo y fecha de siembra.

Las precipitaciones y las diferencias de temperatura en fechas tempranas del ciclo del cultivo producen variabilidad en la respuesta de los genotipos, en este sentido, condiciones de frío y alta humedad favorecen la infección inicial de raíces, mientras que, elevada humedad durante estados reproductivos influencia la expresión de síntomas foliares. Como consecuencia de esta interacción y de las interacciones entre loci, la selección efectiva para resistencia a campo requiere de múltiples ambientes o años de evaluación (Lenzi et al., 2015).

En Argentina la información disponible sobre el comportamiento de cultivares de soja frente al SMS es limitada. Se realizaron evaluaciones en condiciones de campo en las provincias de Tucumán (Zamorano et al., 2003), Buenos Aires (Scandiani, 2004) y Córdoba (Lenzi et al., 2005). Se encontraron diferencias en la respuesta de los cultivares a la enfermedad, pero los resultados no siempre coincidieron entre los distintos trabajos, por lo cual es difícil mejorar este carácter en el germoplasma de soja.

Estudios de ligamiento genético con marcadores moleculares han sido utilizados como herramienta para determinar la localización en el genoma de soja de los diferentes QTL (siglas en inglés Quantitative Trait Loci, Loci de Carácter Cuantitativo) que expresan en conjunto la respuesta al SMS. Un cultivar con resistencia durable podría ser desarrollado por la combinación de estos QTLs de resistencia.

5. Mapeo

El mapeo genético consiste en ubicar la posición de genes en un cromosoma determinado. Existen dos tipos de mapa: los genéticos, definidos mediante unidades de recombinación y los físicos, donde la distancia entre loci es medida mediante unidades de nucleótidos.

5.1 *Mapas Genéticos*

Para la construcción de un mapa genético se considera que la distancia entre dos locus está definida como la cantidad de eventos de recombinación ocurridos entre estos. A partir de la frecuencia de recombinación entre los marcadores se puede inferir su posición relativa y la distancia en centiMorgan (cM) que es la unidad de distancia genética entre dos loci y equivale a una frecuencia de recombinación del 1% (1 de 100 individuos recombinantes).

Existen algunas funciones de mapeo que son usadas para convertir fracciones de recombinación en unidades de distancia genética. Las tres más comunes son:

- Kosambi: cuando se considera un cierto grado de interferencia.
- Haldane: no se considera interferencia.
- Morgan: se considera interferencia completa y distancias pequeñas (Semagn et al., 2006).

La distancia entre marcadores moleculares (MM) es un valor relativo para cada población de estudio y cuando ocurre desequilibrio de la segregación esperada debido al ligamiento genético, la proporción de recombinación entre locus va de 0 a $< 0,5$, mientras que, se consideran no ligados a los locus que muestran una proporción de recombinación de $0,5$ (Kearsey y Pooni, 1998).

Estadísticamente se utiliza el concepto de puntuación LOD (Z) que es el \log_{10} del cociente de verosimilitudes. Un cociente de verosimilitudes igual a 1000 equivale a un LOD de 3 ($Z=3$), valor mínimo de Z que se requiere para afirmar que existe ligamiento significativo entre dos loci (Morton, 1955), lo cual es equivalente a decir que la hipótesis alternativa (ligamiento) es 1000 más probable que la hipótesis nula (independencia) (Kearsey y Pooni, 1998).

5.1.1 Grupos de ligamiento

Un grupo de ligamiento (GL) incluye todos los genes que están conectados físicamente en un cromosoma. Los genes que están muy próximos entre sí muestran ligamiento directo, mientras que, los que están a más de 50 cM segregan de manera independiente. Los marcadores ligados son agrupados en GL, el número de GL es igual al número de cromosomas (Collard et al., 2005).

Un mapa de ligamiento es un diagrama descriptivo de los genes en cada cromosoma y su uso más importante es la identificación de regiones genómicas asociadas con caracteres de interés (Collard et al., 2005).

6. Mapas de QTLs

El mapeo de QTL es un método estadístico que analiza la manera en que se relacionan dos tipos diferentes de información provenientes de una población de organismos, datos fenotípicos (medición de diferentes características de interés) e información genotípica (marcadores genéticos), ordenada a lo largo de un mapa genético (Miles y Wayne, 2008).

Hay cinco pasos principales para realizar mapeo de QTL: (I) generar una población de mapeo, (II) identificar los marcadores genéticos polimórficos en la población, (III) realizar un análisis de ligamiento de los marcadores genéticos y confeccionar un mapa genético, (IV) realizar una evaluación fenotípica de todos los individuos de la población de mapeo (medición y recolección de datos para los caracteres de interés), buscar correlación entre distintos caracteres y (V), realizar un análisis de correlación entre los valores promedio de los caracteres fenotípicos y los diferentes marcadores genéticos (Collard et al., 2005).

6.1 *Diseño básico de una población biparental de mapeo*

En especies autógamas se eligen dos genotipos parentales altamente homocigóticos, endocriados que difieren entre sí para al menos el carácter de interés.

Luego, las líneas parentales se cruzan obteniéndose la generación F1 compuesta por individuos heterocigotos, los cuales son autofecundados creando así una población F2 o bien, son cruzados con una de las líneas parentales (parental recurrente) para crear una progenie de retrocruzadas (Darvasi, 1998).

Cualquiera de estas cruzas produce individuos que contienen diferentes fracciones del genoma de cada línea parental. Las líneas recombinantes endocriadas o RILs (siglas en inglés, Recombinant Inbred Lines) son generadas a partir de una población F₂, por descendencia de semilla única hasta conseguir homocigosis en los loci segregantes. Cada línea obtenida al final del proceso representará los diferentes bloques de ligamiento presentes en los individuos F₂ de la población original, pero, en estado homocigota. Una vez estabilizadas las RILs pueden ser mantenidas y multiplicadas año tras año y se denominan inmortales (Miles y Wayne, 2008).

Respecto al tamaño de la población, cuanto mayor es, más preciso es el mapa genético y mayor es la probabilidad de detectar QTLs de efectos menores (Tanksley, 1993). Un aumento del tamaño de la población proporciona mayor poder estadístico, y mejor estimación de los efectos genéticos y de los intervalos de confianza de la localización de los QTLs. Sin embargo, llega un punto en que el aumento del tamaño poblacional apenas repercute en la potencia del análisis, siendo más recomendable el aumento del número de marcadores. La precisión aumenta con la densidad de marcadores a partir de los 5 – 10 cM (Darvasi et al., 1993).

6.2 Marcadores Genéticos en el análisis de QTL

Hay tres tipos de marcadores que pueden ser utilizados para el diseño de mapas genéticos: marcadores morfológicos o clásicos (caracteres fenotípicos), marcadores bioquímicos (variantes alélicas de enzimas, denominadas isoenzimas; Proteínas de Reserva) y marcadores moleculares (segmentos de ADN con ubicación determinada). Los marcadores deben diferenciar las líneas parentales y el loci del marcador tiene que ser polimórfico, esto significa poseer para una población biparental al menos dos formas alélicas distinguibles.

Para caracterizar genóticamente cada individuo de una población de mapeo, los MM son los más utilizados por ser los más numerosos en el genoma. Con este tipo de marcadores se pueden realizar mapas genéticos saturados, logrando una cobertura completa del genoma. Además, no son influenciados por factores ambientales ni varían según las etapas de desarrollo de la planta (Collard et al., 2005).

Las segregaciones esperadas para marcadores moleculares (MM) dominantes y codominantes para distintos tipos de poblaciones son mostrados en la tabla 1:

Tabla 1: Segregaciones esperadas de marcadores moleculares para diferentes tipos de poblaciones.

Tipo de Población	Codominante	Dominante
F2	1:2:1 (AA:Aa:aa)	3:1 (A_: aa)
Retrocruza	1:1 (Aa:aa)	1:1 (Aa:aa)
RILs o DH	1:1 (AA:aa)	1:1 (AA:aa)

Para comprobar si los marcadores segregan en las proporciones esperadas se realizan las pruebas de Chi – cuadrado (Snedecor, 1964) porque pueden encontrarse marcadores con segregación distorsionada, por ejemplo, debido a errores en la genotipificación u otros motivos (Collard, et al., 2005).

Se han utilizado diversos tipos de marcadores moleculares para el desarrollo de mapas genéticos como: RFLP (siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphisms, Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (siglas en inglés, Random Amplified Polymorphic DNA, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente), SSRs (siglas en inglés, Simple Sequence Repeats, secuencias simples repetidas), AFLP (siglas en inglés, Amplified Fragment Length Polymorphism, polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), SNPs (siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorphisms, polimorfismos en un único nucleótido), ESTs (siglas en inglés, Expressed Sequence tags, marcas de secuencia expresada) (Gupta et al., 1999). Debido a sus ventajas, algunos de ellos se han vuelto muy comunes en el desarrollo de mapas genéticos, si bien los marcadores a elegir dependen de la población y la situación de la investigación (Zhang et al., 2009).

6.2.1 Secuencias simples repetidas

Estos marcadores son técnicamente simples, robustos, confiables y transferibles entre poblaciones. Denominados también microsatélites. Son secuencias simples en tándem de mono, di, tri, tetra, pentanucleótidos repetidas entre diez y cien veces. Los SSRs se detectan mediante su amplificación por PCR (siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando iniciadores específicos de 20 a 30 pares de bases (pb) de longitud que hibridan en la región que flanquea el tándem de repeticiones. El

polimorfismo entre individuos está dado por la variación en el número de repeticiones. Requieren la preparación de geles de poliacrilamida para ser visualizados. (Collard et al., 2005).

6.2.2 Polimorfismos en un único nucleótido

Estas variaciones en la secuencia de ADN afectan a una única base en una secuencia de ADN del genoma. También pueden ser considerados cambios en unos pocos nucleótidos como inserciones o deleciones (InDels). Una de estas variaciones debe darse en al menos un 1% de la población para ser considerada como SNP (Zhu et al., 2003).

Estos marcadores son de naturaleza bialélica y muy abundantes, siendo la frecuencia de SNP uno cada 100-300 pb para genomas de plantas. Los SNPs pueden localizarse en regiones codificantes, regulatorias y no codificantes. Cuando están presentes en regiones codificantes muestran 100% de asociación con el carácter de interés, por lo que son muy útiles en Selección Asistida por Marcadores (SAM) (Martínez et al., 2010).

6.3 *Diseño del Mapa Genético*

El mapa genético es un mapa de ligamiento que indica la posición y las distancias genéticas relativas entre marcadores a lo largo de los cromosomas. Las distancias genéticas existentes entre los marcadores se estiman por la frecuencia de recombinación entre ellos; esta distancia no siempre es proporcional a la distancia física, porque la frecuencia de recombinación está influenciada por otros aspectos (homología entre genomas, región cromosómica, proximidad al centrómero).

La posición relativa de los marcadores en el mapa se deduce de las distancias relativas de unos a otros a partir de estimas entre dos, tres o más loci. Los errores de la genotipificación y los datos perdidos pueden afectar al orden y las distancias entre marcadores del mapa de ligamiento (Hackett, 2002).

En una población segregante (población derivada de reproducción sexual) hay una mezcla de genotipos parentales y recombinantes. La frecuencia de genotipos recombinantes puede ser utilizada para calcular las fracciones de recombinación mediante las cuales se infieren las distancias entre marcadores. Una baja frecuencia de recombinación entre dos

marcadores indica la cercanía de éstos en un cromosoma. Los marcadores que tienen una frecuencia de recombinación del 50% están no ligados y se encuentran localizados lejos en un cromosoma o en diferentes cromosomas (Collard et al., 2005).

6.4 Evaluación fenotípica de la población de mapeo

La población de mapeo debe ser evaluada fenotípicamente para los caracteres de interés antes del análisis de QTL. La información debe ser recolectada para todos los individuos de la población, incluyendo los parentales. La información fenotípica debe ser precisa, se deben utilizar diseños experimentales que favorezcan la expresión y distinción de los caracteres a evaluar (Tanksley, 1993).

6.5 Métodos de detección de QTL

Los QTLs se detectan basándose en la asociación entre el fenotipo y los genotipos de loci de marcadores polimórficos de cada uno de los individuos de una población segregante. Un marcador divide a la población en diferentes grupos genotípicos a partir de la presencia o ausencia de los alelos de un determinado locus (en homocigotos y heterocigotos, en el caso de los marcadores codominantes, o en presencia o ausencia de un alelo, en el caso de los dominantes). Si el análisis de varianza muestra diferencias significativas entre las medias del carácter de cada grupo genotípico, este marcador está ligado a un QTL que controla el carácter analizado. Esto se explica porque cuanto más cerca se encuentre un marcador de un QTL, menor será la oportunidad de recombinación entre ellos y mayor será la probabilidad de que se hereden juntos en la descendencia. En cambio, si un marcador y un QTL no se encuentran ligados, ambos se heredan independientemente y no habrá diferencias significativas entre las medias de los grupos genotípicos (Tanksley, 1993).

Los métodos más utilizados frecuentemente en el mapeo de QTL son: el Análisis de Marcador Individual, el Mapeo por Intervalo Simple (siglas en inglés, SIM, Simple Interval Mapping) y el Mapeo por Intervalo Compuesto (siglas en inglés, CIM, Composite Interval Mapping) (Collard et al., 2005).

6.5.1 Análisis de Marcador Individual

Es un método simple para detectar QTLs asociados con un único marcador. Los métodos estadísticos utilizados para el análisis incluyen test t , análisis de varianza (ANOVA) y regresión lineal. Mientras que, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica la variación fenotípica del QTL ligado al marcador. Este método no requiere un mapa de ligamiento completo ni que las distancias entre marcadores sean pequeñas, ya que la única información que aporta es la existencia de un QTL próximo a un marcador y no su localización precisa en el genoma. El análisis marcador a marcador es poco informativo, ya que la detección de la asociación entre un QTL y un marcador depende tanto del grado de ligamiento entre ambos como de la magnitud de los efectos genéticos del QTL; es decir, con esta metodología, para un mismo nivel de significación estadística de la asociación, no se distingue entre un QTL con efecto genético pequeño que esté próximo al marcador, o un QTL con efecto importante pero alejado del marcador. Por tanto, este método puede fallar en la estimación del número y la posición de los QTLs y de la magnitud de sus efectos (McMillan y Robertson, 1974; Lander y Botstein, 1989).

6.5.2 Mapeo por Intervalo Simple

El SIM utiliza el mapa de ligamiento y busca QTLs en los intervalos entre pares de marcadores contiguos a lo largo de los cromosomas. Así, se calcula el “mapa de probabilidad” a lo largo de cada GL. La significación de la hipótesis de presencia de un QTL se expresa por la LR o la LOD (siendo la primera la relación entre la probabilidad de que exista un QTL en una localización dada, y la de que dicho intervalo muestre la misma asociación con el fenotipo sin que exista realmente un QTL, y la segunda el logaritmo de esta relación). En las regiones cromosómicas en las que dicha relación de probabilidades supera un umbral predeterminado, se declara la existencia de un QTL, asumiendo que su localización corresponde al punto que proporciona el cociente máximo (Lander y Botstein, 1989). El SIM se considera estadísticamente más eficaz que el análisis marcador a marcador, ya que, al analizar simultáneamente los intervalos entre pares de marcadores adyacentes ligados a lo largo de los cromosomas, se compensa el efecto de la recombinación entre marcadores y QTL y, por tanto, se pueden estimar con cierta precisión tanto la posición como la magnitud de los efectos genéticos del QTL (Collard, et al., 2005).

6.5.3 Mapeo por Intervalo Compuesto

El CIM es una ampliación del SIM. Proporciona una mejor resolución de los QTLs porque incluye la varianza de otros QTLs, localizados en regiones cromosómicas diferentes (incluyendo los efectos asociados a marcadores que no se encuentran en ningún grupo de ligamiento) como cofactores en la estima de los efectos de un intervalo dado. Gracias al uso de cofactores, el CIM tiene en cuenta la variación debida a QTLs importantes y aumenta la eficacia de detección de QTLs de efectos menores (Young, 1996).

6.6 Potencia y precisión del mapeo de QTL

La potencia de un test de detección de QTL es definido como la probabilidad de detectar un QTL en un nivel dado de significancia estadística, lo que depende principalmente de la magnitud de expresión del QTL y del número de progenie de la población.

Cada test de detección de QTL provee una estimación de la potencia, o sea, si el QTL tiene un efecto mayor, intermedio o menor en la explicación de la varianza fenotípica de un carácter. Esta variabilidad puede determinar si el QTL es estadísticamente significativo. Se pueden definir tres categorías de QTL: 1- QTL fuertes, son aquellos que explican más del 20% de la varianza, los caracteres controlados por estos QTL pueden ser considerados cuasi mendelianos. 2- QTL moderados, explican entre un 1 y 20%, pueden ser detectados con poblaciones de tamaño manejable, pero no necesariamente con una alta potencia. 3- QTL débiles, que explican 1% o menos de la varianza del carácter y requieren como mínimo una progenie de 1000 individuos para que sean detectados con alta potencia (Collard et al., 2005).

6.7 QTLs asociados a resistencia al SMS

Se encontraron un total de 58 QTLs que proveen resistencia a la enfermedad en poblaciones biparentales (www.soybase.org, noviembre 2016). Se confirmaron 14 QTLs en RILs (Chang et al., 1996; Farias Neto et al., 2007; Hnetkovsky et al., 1996; Iqbal et al., 2001; Kassem et al., 2007, 2012; Kazi et al., 2008; Lightfoot et al., 2005; Meksem et al., 1999; Njiti et al., 1997, 2002; Prabhu et al., 1999; Sanitchon et al., 2004; Yamanaka et al., 2006) y se demostró que estos QTLs confieren resistencia en hoja y raíz frente a SMS causado por

Fusarium virguliforme (Kassem et al., 2012; Kazi et al., 2008; Njiti et al., 1998; Triwitayakorn et al., 2005).

Dos de estos QTLs son comunes en cuatro poblaciones utilizadas por distintos autores Essex × Forrest (EF), Pyramid × Douglas (PD), Flyer × Hartwig (FH) y PI438489B × Hamilton (PH), uno de estos está localizado en el GL C2 y el otro en el GL G.

Otros dos QTLs son comunes entre las poblaciones EF y FH, uno localizado en el GL G y otro en el GL I, mientras que, las poblaciones PD, FH y Ripley × Spencer tienen un QTL en común en el GL D2 y las poblaciones PD, FH y PH tienen un QTL en común en el GL N.

Los QTLs restantes son únicos en las poblaciones donde fueron detectados, y se consideran población específicos.

Luckew et al. (2013) evaluó y confirmó diez QTLs de resistencia a SMS en líneas derivadas F2 de seis poblaciones, sugiriendo el apilamiento de QTLs para lograr resistencia duradera (tabla 2).

Tabla 2: QTLs de resistencia al Síndrome de la Muerte Súbita (Luckew et al., 2013).

QTL	SSR	GL	Referencias
Rfs	Sat_403	G	Njiti et al. (1998); Meksem et al. (1999); Prabhu et al. (1999); Iqbal et al. (2001); Njiti et al. (2002); Triwitayakorn et al. (2005)
Rfs2	Satt309	G	Meksem et al. (1999); Iqbal et al. (2001); Njiti et al. (2002); Triwitayakorn et al. (2005)
qRfs3	Satt163	G	Chang et al. (1996); Iqbal et al. (2001); Kazi et al. (2008)
qRfs4	Satt371	C2	Hnetkovsky et al. (1996); Iqbal et al. (2001); Njiti et al. (2002); Kazi et al. (2008); Kassem et al. (2012)
qRfs5	Satt354	I	Iqbal et al. (2001)
qRfs6	Satt80	N	Chang et al. (1996); Njiti et al. (2002)
qRfs7	Sat_001	D2	de Farias Neto et al. (2007); Kazi et al. (2008)
qRfs11	Satt138	G	Lightfoot et al. (2007)
qRfs12	Satt160	F	Kassem et al. (2006)
Rfs16	Satt353	H	Dr. Lightfoot, comunicación personal

QTL: Loci de carácter cuantitativo; SSR: microsatélite; GL: grupo de ligamiento.

7. Componentes de la Varianza

La genética de un carácter cuantitativo gira alrededor del estudio de su variación, que puede ser separada en componentes atribuibles a diferentes causas como, la varianza genotípica, que es la varianza de los valores genotípicos, y la varianza ambiental, que es la varianza de las desviaciones ambientales. Mientras que, la varianza total es la varianza fenotípica y es la suma de las diferentes componentes, además de la interacción genotipo-ambiente (Falconer, 1984).

La varianza genotípica se origina por las diferencias que existen entre genotipos, por lo que, mientras mayor sea el número de loci segregantes, mayor será el número de genotipos diferentes en la población (Molina, 1992). La varianza ambiental comprende toda la variación de origen no genético, y gran parte de ésta se encuentra fuera del control del investigador (Falconer, 1984). La varianza de la interacción genotipo-ambiente mide el comportamiento diferencial de los genotipos según el ambiente en el que se desarrollan (Chaves, 2001).

7.1 Heredabilidad

La heredabilidad de un carácter cuantitativo es una de sus propiedades más importantes en las poblaciones, pues expresa la proporción de la varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes.

Representa también una medida de la importancia relativa de la variación heredable respecto a la variación fenotípica. En sentido amplio, la heredabilidad (H^2) es el cociente de la varianza genotípica y la fenotípica; en sentido estricto (h^2) es el cociente de la varianza aditiva y fenotípica.

La heredabilidad puede variar en distintos caracteres del mismo organismo, para el mismo carácter en organismos distintos e incluso para el mismo carácter en poblaciones distintas del mismo organismo, por eso no es una propiedad intrínseca de los caracteres (Falconer, 1984).

De acuerdo con Stanfield (1971), los caracteres se consideran de heredabilidad alta cuando ésta es mayor que 0,50; de heredabilidad media entre 0,20 y 0,50 y de heredabilidad baja si es menor a 0,20.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar QTLs asociados con la respuesta al SMS (*F. tucumaniae*) en una población de RILs proveniente de un cruzamiento biparental entre los cultivares de soja NA4613RG y ADM4800.

Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta fenotípica frente a *Fusarium tucumaniae* de una población de RILs en condiciones de campo;
- Caracterizar con marcadores moleculares regiones genómicas asociadas a la respuesta al SMS en soja;
- Realizar la asociación entre índice de la enfermedad y marcador molecular.

HIPÓTESIS

En Argentina se reportó la presencia de *Fusarium tucumaniae* como especie predominante responsable del SMS. Durante varias campañas agrícolas se realizó el estudio del comportamiento de genotipos de soja frente a éste, bajo condiciones de campo e invernáculo, donde dos cultivares argentinos mostraron las mejores respuestas de resistencia y susceptibilidad a lo largo de los años.

La población de RILs obtenida del cruzamiento de los cultivares argentinos NA4613RG y ADM4800 presenta QTLs asociados a la respuesta fenotípica al SMS causado por *Fusarium tucumaniae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó una población de 149 RILs F2:F9 obtenidas a partir del método SSD (siglas en inglés, Single Seed Descent, Descendientes de una única semilla) (Fehr, 1987) desde la generación F2 proveniente del cruzamiento de dos cultivares de soja argentinos, con diferente comportamiento frente al SMS en condiciones de campo durante las campañas agrícolas 2004, 2005 y 2006 (Lenzi et al., 2005; Lenzi et al., 2007; Lenzi et al., 2007).

El cultivar ADM4800 perteneciente al grupo de madurez (GM) IV se seleccionó por expresar la mejor respuesta de resistencia al SMS, mientras que, el cultivar NA4613RG del mismo GM por expresar susceptibilidad (Lenzi et al., 2005; Lenzi et al., 2007; Lenzi et al., 2007). ADM4800 presentó niveles de resistencia similares a cultivares de EE. UU que han sido utilizados como fuentes de resistencia como es el caso de: Forrest, Hartwig, Ripley y Pyramid (Gibson et al., 1994; Njiti et al., 1996; Iqbal et al., 2001; Farias Neto et al., 2007; Kazi et al., 2008), lo cual indica que ADM4800, además de poseer caracteres de adaptación a las condiciones agroecológicas de la zona, también, cuenta con una combinación de genes adecuada para el control de la enfermedad.

2. Caracterización fenotípica

2.1 Experimentos a campo

Los ensayos de caracterización a campo se llevaron a cabo en un lote de producción situado a 7 km al sur de la localidad de Inrville (Latitud Sur 32° 40' y Longitud Oeste 61° 52'), Departamento Marcos Juárez, el cual presenta infestación natural con *Fusarium tucumaniae*, durante las campañas agrícolas 2012 - 2013, 2013 - 2014, 2014 - 2015 y 2015 - 2016, cuyas fechas de siembra fueron: 07/11/2012, 13/11/2013, 13/11/2014 y 16/11/2015, respectivamente.

Además se realizó inoculación artificial utilizando como inóculo, granos de sorgo colonizados por un aislamiento de *F. tucumaniae* denominado Ft 411-11 proveniente del CEREMIC (CR - Centro de Referencia de Micología), Facultad de Ciencias Bioquímicas y

Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, el cual fue sembrado junto a las semillas de soja en una proporción de 6 gr/m de surco (Farias Neto et al., 2007), utilizando una sembradora experimental de dos surcos para siembra directa (Lenzi et al., 2005; Lenzi et al., 2007; Lenzi et al., 2007) .

2.2 Preparación de inóculo para inoculación artificial

Para la preparación del inóculo, se cultivó un aislamiento del hongo en PDA (Agar – Papa – Dextrosa) por una semana a 25 °C. Las colonias fueron transferidas a 125 gr de granos de sorgo previamente esterilizados e incubadas por tres semanas a 25°C. Luego de este tratamiento, las semillas de sorgo infectadas con el hongo fueron utilizadas como inóculo en la proporción ya mencionada.

2.3 Diseño experimental

El diseño experimental se realizó sembrando cada RIL en bloques incompletos aleatorizados con tres repeticiones, cuya unidad experimental fue representada por una parcela de dos surcos y tres metros de largo con distanciamiento entre surcos de 0,52 metros, con 120 plantas viables por unidad experimental. Además, se incluyeron tres repeticiones del parental ADM4800, utilizadas como control y 30 repeticiones del parental susceptible, NA4613RG, usadas como control para evidenciar la presencia de enfermedad.

En cada campaña agrícola evaluada se descartó la presencia de otras patologías, cuyos síntomas foliares podrían confundirse con SMS, mediante la extracción de plantas con síntomas típicos de SMS y evaluación de tallos y raíces bajo lupa en laboratorio.

2.4 Evaluación de la enfermedad

Para determinar la respuesta de cada RIL frente al SMS, se evaluaron semanalmente desde la detección de síntomas iniciales hasta fines del estado fenológico R6 las siguientes variables:

- **Incidencia:** estimada en cada parcela a partir de la aparición de síntomas foliares utilizando la siguiente ecuación;

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{número de plantas con síntomas}}{\text{número de plantas totales}} \times 100$$

- **Severidad:** porcentaje del área foliar de cada planta afectada por la enfermedad. Según Yamanaka et al. (2006) representa el grado promedio de severidad de todas las plantas con síntomas foliares del SMS en la parcela. La escala utilizada es de cero a cinco como se indica en la tabla 3 y en la figura 2.

Tabla 3: Escala de severidad (Yamanaka et al., 2006).

Clase	AFA
0	Sin síntomas
1	Hasta 25%
2	Entre 25 y 50%
3	Entre 50 y 75%
4	Más del 75%
5	100% Plantas muertas por SMS

AFA: área foliar afectada.

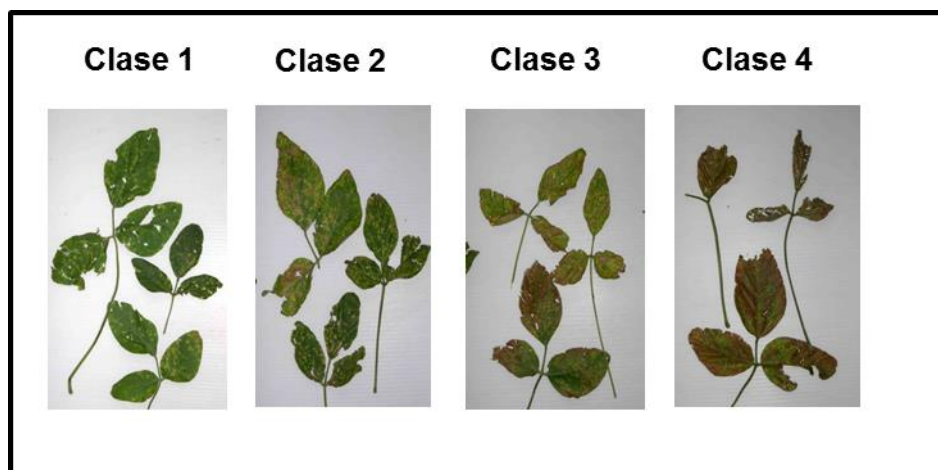


Figura 2: Escala de Severidad propuesta para Síndrome de la Muerte Súbita (Yamanaka et al., 2006).

- **Índice de la Enfermedad (IE_i):** representa una estimación de la proporción del área foliar afectada del total de cada parcela.

$$IE_i = (I_i \times S_i) / 5$$

IE_i= Índice de la enfermedad en la i-ésima observación;

I_i= Incidencia de la enfermedad en la i-ésima observación;

S_i= Severidad en la i-ésima observación.

El divisor **5** representa el valor más alto de la escala de severidad y establece el posible rango de valores de IE de **0** a **100 %**.

La escala varía de cero a 100, donde cero representa plantas sin síntomas frente a SMS y 100 todas las plantas de la parcela muertas.

3. Caracterización Molecular

3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de cada parental y RIL se realizó a partir de tejido foliar, siguiendo el protocolo de Weining y Langridge (1991) modificado. Se recolectó 0,5 gr de tejido foliar en un microtubo y se homogeneizó en N₂ líquido. Se agregó 600 µl de solución de extracción (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl) y 160 µl de SDS 20%. Se incubó 1 hora a 65°C, agitando vigorosamente las muestras cada 15 minutos. Luego se adicionaron 600 µl de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1). Se mezcló vigorosamente para que se forme una sola fase y se centrifugaron las muestras 30 minutos a 14000 rpm. Del sobrenadante 600 µl fueron trasvasados a un microtubo nuevo y se le adicionó alcohol isopropílico a temperatura ambiente y 60 µl de NaAc 2,5 M. Se mezcló muy bien hasta observar el ADN precipitado y se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Se dejó secar y se resuspendió el ADN en 100 µl de buffer TE, adicionándole 2 µl de RNAasa.

La cuantificación del ADN genómico se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV/Vis (Thermo Scientific).

3.2 Marcadores Moleculares

3.2.1 SSRs

Los SSRs (SoyBase: <https://www.soybase.org/>) utilizados en este estudio están localizados en regiones genómicas candidatas a expresar resistencia al SMS, además de otras regiones del genoma de soja como se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: Marcadores Microsatélites analizados en los progenitores, cultivares NA4613RG y ADM4800.

GL	Total de MM analizados
A1	3
A2	13
B1	4
B2	4
C1	6
C2	21
D1a	5
D1b	7
E	10
F	17
G	56
H	7
I	14
J	11
K	5
L	5
M	4
N	16
O	2
Total	221

GL: grupo de ligamiento; MM: marcadores moleculares.

Los SSRs que resultaron polimórficos entre los progenitores fueron evaluados en la población de RILs. En la tabla 5 se describen las secuencias de los cebadores obtenidas de la base de datos pública SoyBase.

Tabla 5: Secuencias de cebadores de microsatélites polimórficos en la población de RILs.

SSR	GL	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
Sat_267	A1	GCGATTGGATGATGGATTTATGAGTT	GCGCCCAACAAGGTGAGAAATCAAGA
Satt207	A2	GCGTTTTTCTCATTGATTCTAAAC	GCGATTGTGATTGTAGTCCCTAAA
Satt228	A2	TCATAACGTAAGAGATGGTAAACT	CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG
Satt168	B2	CGCTTGCCCAAAAATTAATAGTA	CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT
Satt304	B2	GGGTAGTGACGTATTTTCATGGTC	GCGTAAAAACATTCGTTGACTACATAA
Satt194	C1	GGGCCCAACTGATATTTAATTGTAA	GCGCTTTGTGTTCCGATTTTGTAT
Satt371	C2	TGCAAACTAACTGGATTCACTCA	GAGATCCCGAAATTTTAGTGAACA
Satt172	D1b	AGCCTCCGGTATCACAG	CCTCCTTTCTCCCATTTT
Satt160	F	TCCCACACAGTTTTTCATATAATATA	CATCAAAAGTTTATAACGTGTAGAT
Satt145	F	AGCATATGGGATACAAGTGATTAG	CGGTGTTGGTGTGGTATGT
Satt334	F	GCGTTAAGAATGCATTTATGTTTAGTC	GCGAGTTTTTGGTTGGATTGAGTTG
Sat_210	G	GCGCCAGCAACAAAGTTCCTGACAAA	GCGCATGCAATGAATAATAA
Satt309	G	GCGCCTTCAAATGGCGTCTT	GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT
Sat_168	G	TGTGGATAAAAGAGCATTCAAATG	GCGATCCTTGTTTATCTCAAAAAAGTGT
Satt688	G	ATGCCTCCAAAGAGAAAT	CTGCCATTGACCCATCT
Satt353	H	CATACACGCATTGCCTTTCCTGAA	GCGAATGGGAATGCCTTCTTATTCTA
Sat_105	I	TTCCATACAAGATATCAAGTGAATTG	GCTCCCCTACATTGGTAGTAAA
Satt330	I	GCGCCTCCATTCCACAACAAATA	GCGGCATCCGTTTCTAAGATAGTTA
Sat_219	I	GCGTCATGCCACGTGATATTTTAT	GCGTGTGTCCCAAATGTGATTCA
Satt285	J	GCGACATATTGCATTAATAACTACTT	GCGGACTAATTCTATTTTACACCAACAAC
Satt547	J	GCGCTATCCGATCCATATGTG	TGATTTGCTAGGTAAAATCA
Sat_093	J	CAAGGACTAAATAAGATTAATCACTT	TATTCATAAGCTTTAATTACACTATAAGAA
Satt697	M	GCGTGCTTTAAATGATTGATTGA	GCGTGCGAACATAACTAATACAT
Satt009	N	CCAACCTGAAATTAAGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAACCCCTT
Satt478	O	CAGCCAAGCAAAAGATAAATAATA	TCCCCACAAGAGAACAAGAAGGT

GL: grupo de ligamiento; SSR: microsatélite.

Los fragmentos fueron amplificados mediante la PCR, realizada en un volumen final de 15 µl, conteniendo 20 ng de ADN molde, 5µM de cada cebador, 100 µM de cada dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 1X de buffer (Buffer 5X GoTaq Promega) y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa. El ADN fue desnaturalizado a 95°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificación de la PCR de: desnaturalización por 45 segundos a 92°C, apareamiento por 45 segundos a 47°C y extensión por 45 segundos a 68°C. Para la amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los productos obtenidos

se separaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, en una cuba Hoefer SE 600 Ruby, durante 24 horas, a voltaje constante (60 V) y fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos amplificados.

3.2.2 SNPs

Se diseñaron 18 pares de cebadores (tabla 6) para la detección de SNPs localizados en regiones de resistencia asociadas a SMS en el GL G (SoyBase: <https://www.soybase.org/>). Para el diseño de los cebadores se utilizó el software Primer Express ® versión 3.0 (Applied Biosystems) y las secuencias candidatas obtenidas de SoyBase.

Tabla 6: Secuencias de cebadores de SNPs analizados en los cultivares NA4613RG y ADM4800

Secuencia	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
Barc-013305-00475	CCCCAATAACTGAACGGAAG	GGCCGGACAGGAACAATTA
Barc-035305-07162	ACTGCCCATCCATTTACAGG	GGGACAAAGGCACACAAGTT
Barc-010495-00656	GAGCCTTTTGTTCCTTTAAGTCC	TGAAACTCTTCGTTTCCATACATC
Barc-044741-08783	GAAATGTTCTGGTGGTGTGTAA	AGTCTGAGAAGCAAATTCGGATA
Barc-010491-00654	CCACAACTCAACTCAACTGTAAAATTATCC	GGCATGTTGTACCCGTTCTT
Barc-031193-07008	TTGGTTCTTCATCTGATTTGGA	CCCATTGATTTGGTTGCAGT
Barc-040605-07795	TGTGATCCTTCTGCACATTCA	GCGAATGTTAGCACTTAGCAG
Barc-043995-08574	GAACAAAATTGAAAGCACTTGTGA	TCTTCCTTTCTTGCCTCTGA
Barc-021603-04153	CCAGAAGCCAAGCAAGAACT	AAAACTGAACGGAAAGTGC
Barc-031121-06998	CTACCATTGCTGGCTTCACC	TCCACCCTACAAAACCCATC
Barc-017185-02246	TTACATGCAGAGGAGGCAAA	TGAGAGCAATCCGTGATGAG
Barc-024489-04936	TGCTCACCATTCAAATTGG	CAAGCCTCTCGTTTTGGTCT
Barc-019001-03049	TTCCGAAACGAAACATGTGA	TTGAGCAGAACAACCCCTTT
Barc-018441-03188	AAATTCCTGAAGGCAAATG	AGTCTGCCACAATTGCAAGA
Barc-017681-03105	TTGATGCAACCAAATTCAG	ACAGGATCAAATGCATGA
Barc-015063-02553	GCCTGTACCGGTTCAAATA	CCGAAAAGGAACAACTCCA
Barc-039091-07442	GATTCAACTCGCCCTCAT	CAAATCCGACAGCTAAGTAAACG
Barc-017669-03102	ACTCGCTTCGGTTCAAGAAA	TATAGGCGTTTTGCCTCCTC

La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en placas ópticas de 96 pocillos, las cuales fueron selladas con un film adhesivo óptico. El volumen final de la reacción fue de 10 µl, conteniendo 10 ng de ADN genómico de soja usado como templado, MeltDoctor™ HRM

Master Mix (Applied Biosystems) (AmpliAq Gold 360 ADN polimerasa, colorante para HRM, una mezcla de dNTPs incluyendo dUTP, sales de magnesio y otros componentes) y 10 µM de cada cebador.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Step One Plus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de ciclado (HRM Experiments User Guide) (tabla 7).

Tabla 7: Condiciones de ciclado de PCR en tiempo real.

Fase	Etapas	Temperatura	Tiempo
Dilatoria	<i>Activación de la enzima</i>	95 °C	10 min
Ciclado	<i>Desnaturalización</i>	95 °C	15 seg
(40 ciclos)	<i>Hibridación / elongación</i>	60 °C	1 min
Curva de disociación	<i>Desnaturalización</i>	95 °C	10 seg
	<i>Hibridación</i>	60°C	1 min
	<i>Disociación de alta resolución</i>	95 °C	15 seg
	<i>Hibridación</i>	60 °C	15 seg

El análisis de las variantes alélicas de los SNP se realizó utilizando el software High Resolution Melt Versión 3.0.1 (Applied Biosystems).

4. Análisis Estadístico

4.1 Caracterización Fenotípica

La variable IE fue transformada a Logaritmo (Ln) de (IE+0,5) y se estimaron medias, valores mínimos y máximos de la variable IE para cada parental (NA4613RG y ADM4800) y RILs. Además, se construyeron histogramas de frecuencias relativas de la población de RILs en cada año de evaluación.

Por otro lado, se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) a fin de determinar la variabilidad del IE para cada RIL, campañas agrícolas de evaluación, repetición y la interacción RILs * Campañas agrícolas de evaluación. Para la comparación de medias se utilizó el test de las diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher ($\alpha=5\%$).

Todos los análisis estadísticos y los gráficos se efectuaron con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2017). Mientras que, para interpretar la interacción RILs * Campañas agrícolas de evaluación se realizó un análisis de estabilidad de Shukla (Shukla, 1972) mediante el programa desarrollado en la sección estadística de la EEA INTA Marcos Juárez (Masiero y Castellano, 1991).

Los componentes de varianza se obtuvieron mediante el procedimiento MIXED (método REML) de SAS (SAS 9.3).

La heredabilidad en sentido amplio (h^2) del IE se calculó a partir de los componentes de varianza (Nyquist y Baker, 1991) como:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{(\sigma_e^2/r + \sigma_{gl}^2/l + \sigma_g^2)}$$

Donde σ_g^2 es la varianza genotípica; σ_e^2 es la varianza del error; σ_{gl}^2 es la varianza de la interacción genotipo x ambiente; r es el número de repeticiones; l el número de localidades.

4.2 Caracterización Molecular

Los MM en cada GL fueron posicionados según las distancias en cM establecidas por Song et al. (2004) y los gráficos para cada GL se obtuvieron con el programa para computadoras GGT 2.0 (Van Berloo, 2008).

Para detectar regiones genómicas asociadas con el IE, las RILs fueron clasificadas como Tipo NA4613RG (A) o Tipo ADM4800 (B) para cada marcador. Los datos de los marcadores fueron comparados con el IE mediante ANOVA (Análisis de Marcador Individual) realizado con el programa para computadoras Infostat (Di Rienzo et al., 2017).

RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica

La población de 149 RILs y los genotipos parentales utilizados como controles, NA4613RG y ADM4800 fueron sembrados en un campo de producción al sur de la localidad de Inrville, provincia de Córdoba durante cuatro campañas agrícolas 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015 y 2015-2016.

La figura 3 muestra la infección lograda en uno de los experimentos realizados en el campo de producción donde fueron conducidos todos los ensayos, el cual presenta infestación natural con el hongo causante de SMS y suplementación de inóculo con infestación artificial.



Figura 3: Parcelas con plantas sanas y plantas con síntomas causados por el Síndrome de la Muerte Súbita.

1.1 Análisis de parentales

Para todas las campañas agrícolas estudiadas el parental susceptible NA4613RG expresó valores máximos de IE que fueron entre 15 y 20, excepto para la campaña 2014-2015 que expresó un valor máximo de IE= 6, mientras que, el parental ADM4800 parcialmente resistente expresó su valor máximo de IE= 2 durante la campaña 2013-2014 (tabla 8). Los valores mínimos de IE fueron entre 0,00 y 0,40 para ADM4800 y 0,00 y 0,80 para NA4613GR en todas las campañas analizadas.

Por otro lado, los valores medios del IE indicaron que ambos parentales mostraron síntomas en todas las campañas analizadas y que los valores más bajos de ADM4800 se debieron a la menor incidencia y/o severidad de este genotipo.

Considerando los valores máximos y mínimos de los parentales se determinó que el rango de variación del carácter IE para las cuatro campañas analizadas fue entre 0,00 y 20,00.

Tabla 8: Valores medios, mínimos y máximos de la variable IE de SMS para cada parental durante las campañas agrícolas 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16.

Genotipo	Variable IE	Media	Mínimo	Máximo
ADM4800	Campaña 2012-2013	0,40	0,00	0,80
NA4613RG	Campaña 2012-2013	10,19	0,00	20,00
ADM4800	Campaña 2013-2014	0,80	0,40	2,00
NA4613RG	Campaña 2013-2014	6,69	1,60	20,00
ADM4800	Campaña 2014-2015	0,13	0,00	0,40
NA4613RG	Campaña 2014-2015	2,48	0,80	6,00
ADM4800	Campaña 2015-2016	0,07	0,00	0,20
NA4613RG	Campaña 2015-2016	5,59	0,80	15,00

IE: Índice de enfermedad; SMS: Síndrome de la Muerte Súbita

1.2 Análisis de RILs

La población de RILs expresó valores de IE dentro del rango de variabilidad detectado para los progenitores, no se observaron segregantes transgresivos, que son aquellos que superan el valor fenotípico de los progenitores en las campañas agrícolas analizadas (Mansur et al., 1996) excepto para la campaña 2013-2014, donde fueron detectadas RILs con valores mínimos de IE= 0,00, mientras que, el parental ADM4800 mostró valores mínimos de IE= 0,40 como se muestra en la tabla 9. Por otro lado, el valor máximo de RILs fue detectado en la campaña 2015-2016 con un IE= 15, no superando al IE del parental susceptible NA4613RG.

Las medias de la población fueron estables para todas las campañas agrícolas evaluadas, con valores de IE entre 2,07 y 2,62, excepto en la campaña 2014 - 2015, donde la media fue menor expresando un IE= 1,21 (tabla 9).

Tabla 9: Valores medios, mínimos y máximos de la variable IE de RILs durante las campañas agrícolas 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16 para el SMS.

Variable IE	Media	Mínimo	Máximo
Campaña 2012-2013	2,62	0,00	12,00
Campaña 2013-2014	2,07	0,00	9,00
Campaña 2014-2015	1,21	0,20	4,20
Campaña 2015-2016	2,45	0,00	15,00

IE: Índice de enfermedad; SMS: Síndrome de la Muerte Súbita

Los histogramas de frecuencias relativas muestran la distribución del IE para la población de RILs (gráfico 1). En las cuatro campañas evaluadas la distribución fue semejante, presentando mayores frecuencias los IE menores y menores frecuencias los IE mayores.

La variación máxima entre RILs fue con IE entre 0,00 y 12 para la campaña 2012-2013, mientras que, la menor variación fue con IE entre 0,00 y 4 para la campaña 2014-2015.

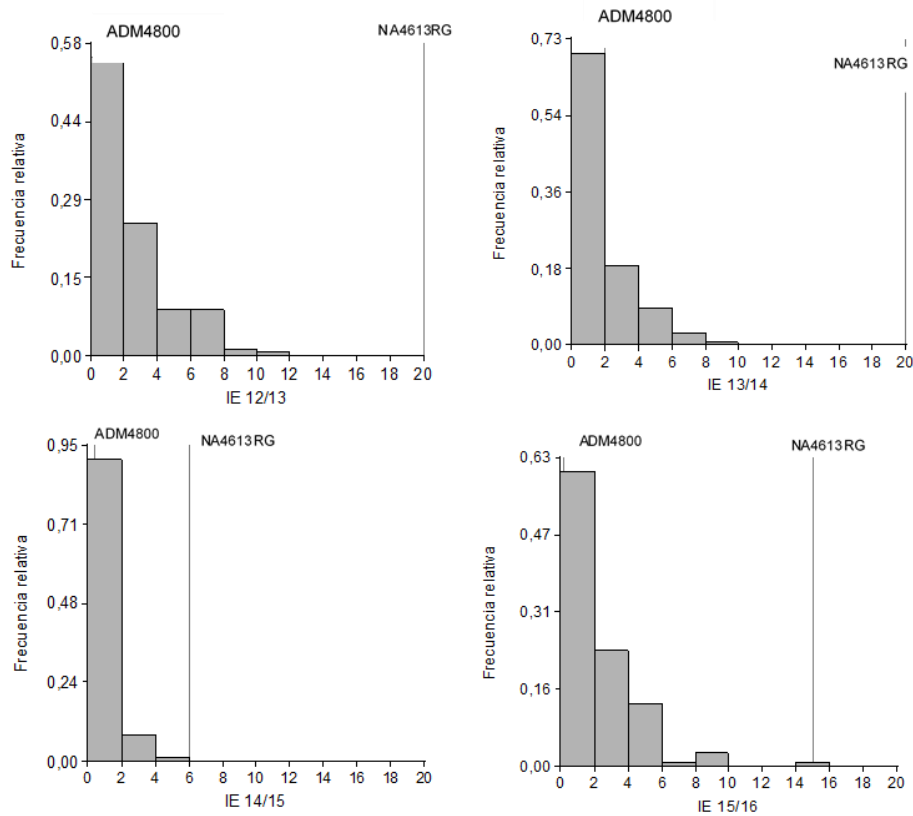


Gráfico 1: Distribución de frecuencias relativas del Índice de Enfermedad (IE) en la población de RILs durante las campañas de evaluación 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16 de Síndrome de la Muerte Súbita (SMS).

Se realizó ANOVA a fin de determinar el efecto de campañas agrícolas de evaluación, repeticiones dentro de cada campaña agrícola, RILs e interacción de RILs * Campaña.

Para todas las fuentes de variación analizadas el ANOVA presentó efectos estadísticamente significativos (tabla 10).

Tabla 10: ANOVA para índice de enfermedad (IE) evaluado durante las campañas agrícolas 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	123,47	609,00	0,20	3,34	<0,0001
Campaña	5,55	3,00	1,85	30,47	<0,0001
Campaña>Rep.	1,85	6,00	0,31	5,09	<0,0001
RILs	74,31	150,00	0,50	8,16	<0,0001
RILs*Campaña	41,76	450,00	0,090	1,53	<0,0001
Error	76,83	1266,00	0,060		
Total	200,30	1875,00			

F.V.: fuente de variación; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios.

El efecto significativo de la interacción RILs * Campaña permitió analizar los datos utilizando el Test de Shukla, el cual determinó la estabilidad del IE de cada RIL a través de las campañas agrícolas evaluadas (Gráfico 2).

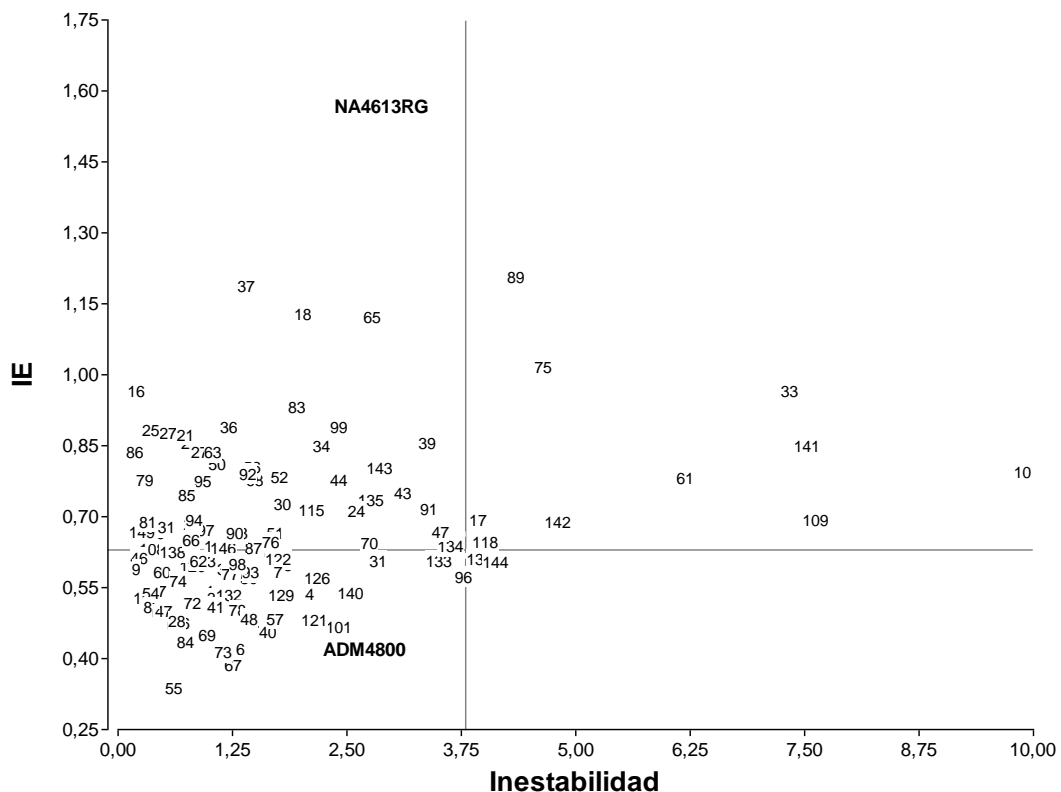


Gráfico 2: Índice de enfermedad (IE) para Síndrome de la Muerte Súbita (SMS) y estabilidad de las RILs durante las campañas agrícolas 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16.

En el gráfico 2 se observa una línea punteada paralela al eje de la Inestabilidad que representa la media general de los IE para todas las campañas agrícolas evaluadas, mientras que, la línea paralela al eje del IE (diferencias significativas) divide las RILs considerando la estabilidad de sus IE en todas las campañas agrícolas evaluadas. De esta forma, el gráfico presenta 4 cuadrantes en los cuales puede ubicarse cada RIL en función de su estabilidad y magnitud de su IE.

Las RILs fueron distribuidas en los cuatro cuadrantes. En el cuadrante superior izquierdo, se localizaron 56 RILs que fueron estables con IE mayor a la media general, pero sin superar al parental susceptible NA4613RG, ubicado también en este cuadrante del gráfico.

En el cuadrante superior derecho, se encontraron diez RILs que tuvieron IE inestable con valores promedios de IE superiores a la media general, en este caso el efecto de inestabilidad se produjo porque en algunas campañas el IE fue superior a la media y en otras inferior. Por otro lado, en el cuadrante inferior derecho, se hallaron dos RILs que tuvieron un IE inestable debido a la causa anterior, pero con IE promedio menor a la media general.

En el cuadrante inferior izquierdo, se encontraron el parental parcialmente resistente ADM4800 y 81 RILs con IE estable y valores promedios inferiores a la media general, de las cuales 27 RILs no mostraron diferencias significativas entre sus medias.

De las 149 RILs de la población estudiada, 137 presentaron valores de IE estables y 12 inestables (gráfico 2). Por otro lado, 27 RILs fueron estables, con IE inferiores a la media general y, a su vez, no presentaron diferencias entre sus medias (gráfico 3). El rango de variación de los IE para estas RILs fue entre 0,31 y 0,49, mientras que, el progenitor ADM4800 presentó un $IE = 0,42$, además, se observó que ocho RILs presentaron un IE promedio inferior a ADM4800.

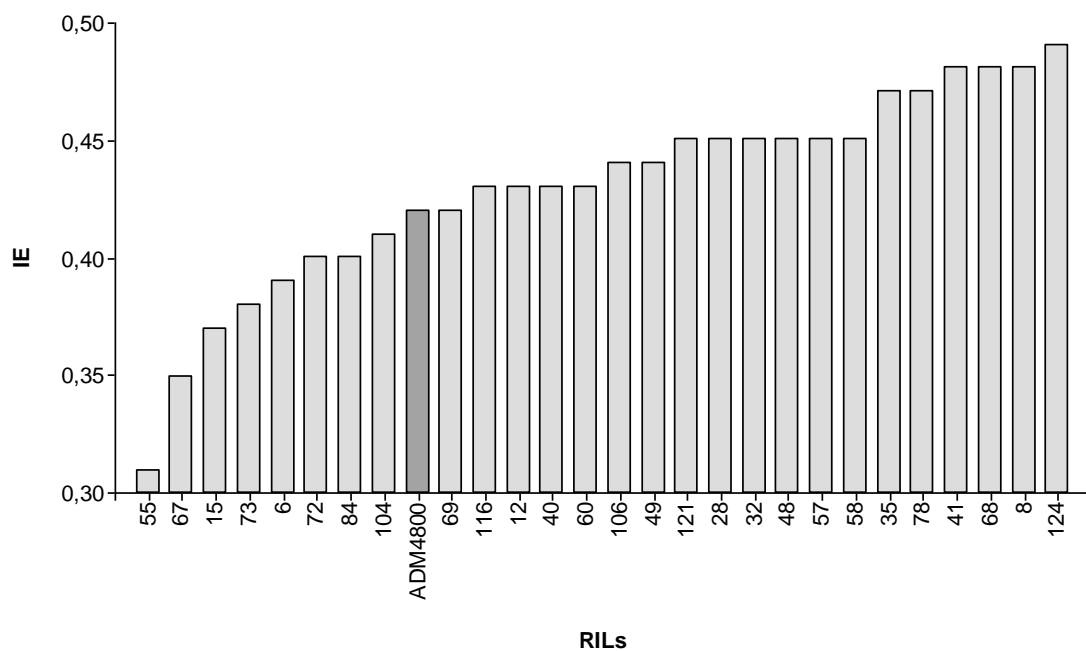


Gráfico 3: RILs con Índice de Enfermedad (IE) estable durante las campañas agrícolas 12/13, 13/14, 14/15 y 15/16 de Síndrome de la Muerte Súbita (SMS).

1.3 Componentes de Varianza

Se determinaron los componentes de varianza para el carácter IE. De la varianza total conocida, el componente genético (RILs) explicó el 44,94%, el ambiente (campañas agrícolas de evaluación) el 10,11 %, las repeticiones dentro de cada campaña el 10,11 % y la interacción RILs * Campaña el 35,22%.

La heredabilidad en sentido amplio o grado de determinación genético (Nyquist y Baker, 1991) fue de 0,54.

2. Caracterización molecular

Un total de 203 SSRs y 18 SNPs fueron amplificados en los parentales de la población; los que resultaron polimórficos fueron amplificados en cada una de las 149 RILs. De los MM analizados, 25 fueron polimórficos entre NA4613RG y ADM4800, evidenciando un 12,5 % de polimorfismo.

La distribución de todos los MM amplificados en los parentales de la población abarcó los 20 GL del genoma de soja y las distancias entre ellos fueron asignadas considerando las distancias en cM descritas por Song et al. (2004) (figuras 4 A – B, 4 C – D, 4 E – F, 4 G y 5 A – B, 5 C – D, 5 E – F, 5 G – H, 5 I – J, 5 K – L y 5 M).

2.1 Regiones Candidatas

En este trabajo se priorizó el estudio de diez regiones genómicas (QTLs) identificadas previamente por expresar respuesta favorable frente al SMS. Estas regiones se localizan en siete GL y fueron descritas por al menos dos autores en diferentes poblaciones de mapeo, bajo distintas condiciones experimentales, excepto los de los GL I, F, H y una región del GL G.

En la figura 4 se muestra la composición alélica de ambos parentales para los 136 MM amplificados en los siete GL, los cuales fueron distribuidos según las distancias en cM descritas por Song et al. (2004).

Para todas las regiones genómicas fueron amplificados los SSRs que identifican cada QTL, excepto Sat_001 del GL D2 y Satt163 del GL G por inconvenientes en la amplificación.

En el GL C2 (figura 4 A) fue caracterizada una región identificada previamente con el marcador SSR Satt371. En esta región fue mapeado el QTL *SDS - Rfs4* que expresa resistencia a SMS. Se probaron 16 SSRs localizados entre los SSRs Satt363 (98,10 cM) y Satt257 (151,90 cM), lo cual permitió analizar toda la región genómica de interés. La distancia mínima entre marcadores fue de 0,70 cM, la distancia máxima de 53,81 cM y la distancia promedio de 3,36 cM. De todos los SSRs amplificados, Satt371 fue polimórfico, ubicado a 145,50 cM.

En el GL D2 (figura 4 B), en la región donde fue mapeado el QTL de resistencia identificado por Sat_001 (*SDS – Rfs7*) fueron amplificados nueve SSRs. El SSR Sat_001 por inconvenientes de amplificación no arrojó resultados. La distancia máxima entre marcadores analizados fue de 39,10 cM, la mínima de 1,61 cM y la promedio de 4,40 cM. No se obtuvieron MM polimórficos en esta región.

En el GL F fueron analizados seis SSRs (figura 4 C) en la región donde fue mapeado el QTL de resistencia a SMS identificado por Satt160 (*SDS – Rfs12*) asociado a rendimiento en campos con síntomas de SMS. La distancia máxima entre los MM analizados fue de 33,73 cM, la mínima de 3,10 cM y la distancia promedio de 5,63 cM. Dos resultaron polimórficos entre los parentales, separados por 22,55 cM, de los cuales uno fue Satt145 y otro Satt160, posicionados a 10,70 y 33,20 cM respectivamente.

En el GL G (figura 4 D) en la región donde fueron mapeados los QTLs identificados por los MM Satt163 y Satt309 (*SDS – Rfs3* y *SDS – Rfs2* respectivamente) fueron amplificados diez SSRs y un SNP. La distancia máxima analizada entre MM fue de 17,90 cM, la mínima de 0,20 cM y la distancia promedio de 2,55 cM. Cuatro resultaron polimórficos, entre ellos, Sat_210 (3,70 cM), Sat_168 (3,90 cM), Satt309 (4,50 cM) y Satt688 (12,50 cM).

En la región donde fue mapeado el QTL *SDS – Rfs* identificado por el SSR Sat_403 fueron analizados cinco SSRs. La distancia máxima entre MM fue 14,80 cM, la mínima 1,60 cM y la distancia promedio 2,96 cM. Los MM resultaron monomórficos entre los parentales.

En la región del GL G donde fue mapeado el QTL *SDS - Rfs11* identificado por Satt138 fueron amplificados 12 SSRs y seis SNPs. La distancia máxima analizada fue de 26,93 cM, la mínima de 0,36 cM y la distancia promedio de 2,06 cM. No fueron encontrados MM polimórficos entre los parentales.

En el GL H donde fue mapeado el QTL *SDS – Rfs16* reconocido por Satt353 se amplificaron tres SSRs (figura 4 E) separados por una distancia promedio de 6,76 cM, resultando polimórfico Satt353 (8,50 cM).

En el GL I fueron amplificados 12 SSRs (figura 4 F) en la región donde fue mapeado el QTL *SDS – Rfs5* identificado por Satt354. La distancia máxima analizada entre MM fue de 42,80 cM, la mínima de 0,30 y la distancia promedio fue de 3,56 cM. Tres MM fueron

polimórficos, Sat_219 ubicado a 10,20 cM de Satt354, Sat_105, a 3,10 cM de Satt354 y Satt330 a 31,60 cM de Satt354.

En el GL N fueron amplificados siete SSRs (figura 4 G) en la región donde fue mapeado el QTL *SDS - Rfs6* identificado por Satt80. La distancia máxima analizada entre MM fue de 30,50 cM, la mínima de 0,20 cM y la distancia promedio de 4,36 cM; uno resultó polimórfico, Satt009, ubicado a 16,60 cM de Satt80.

En las regiones caracterizadas por expresar resistencia a SMS se observó un 17,29 % de datos perdidos por inconvenientes en la amplificación (color rojo en los mapas de la figura 4).

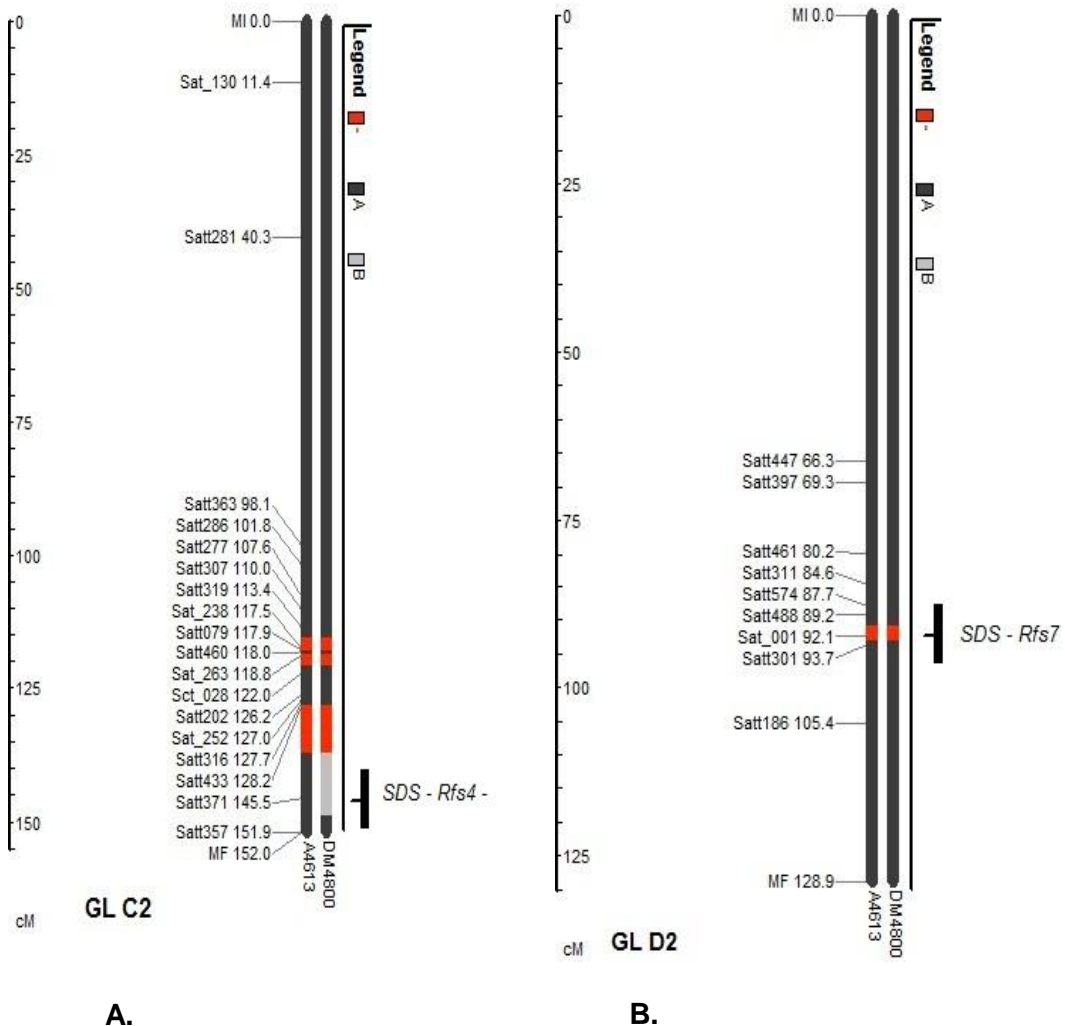


Figura 4 A - B: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento C2 y D2.

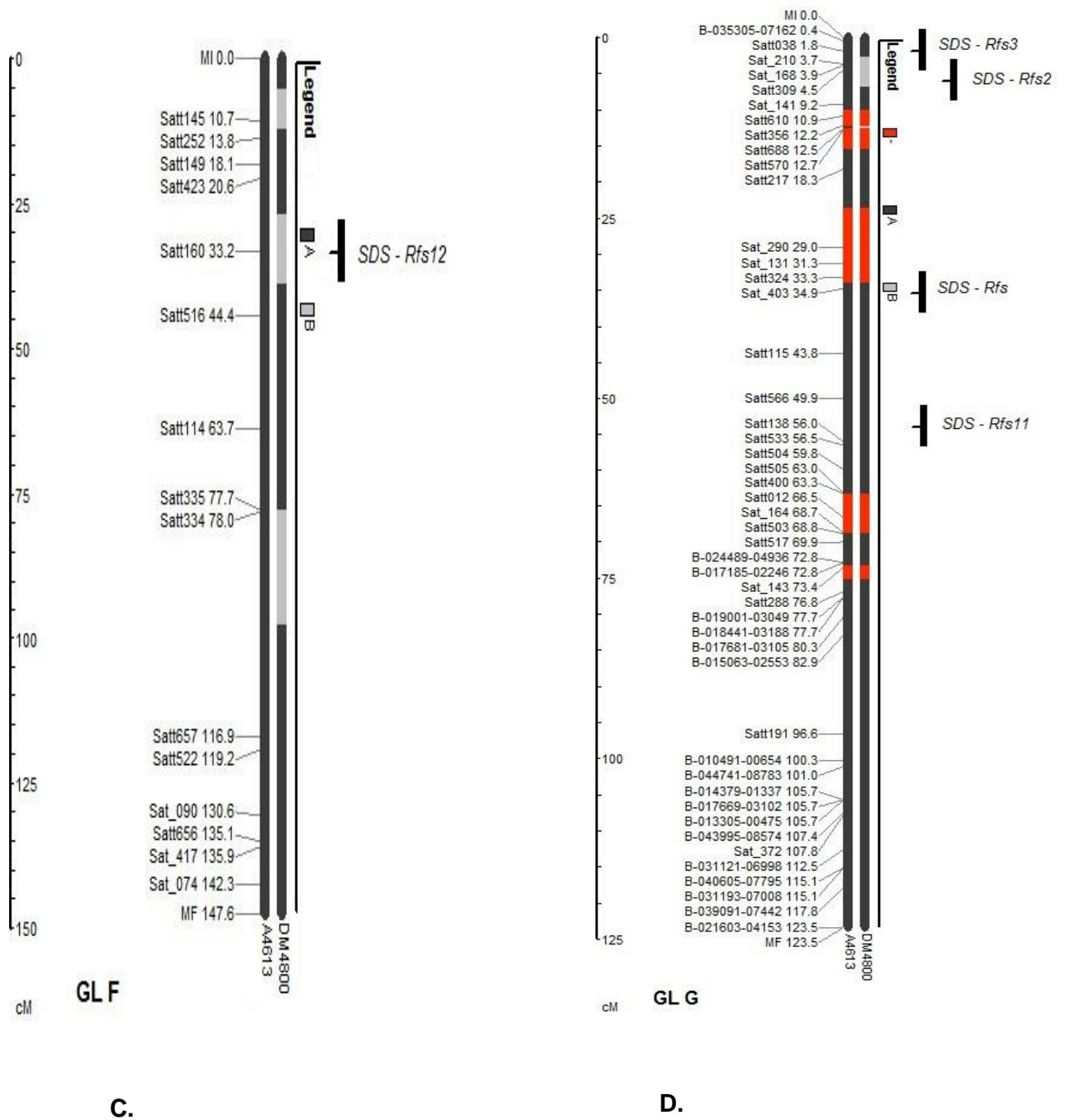


Figura 4 C - D: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento F y G.

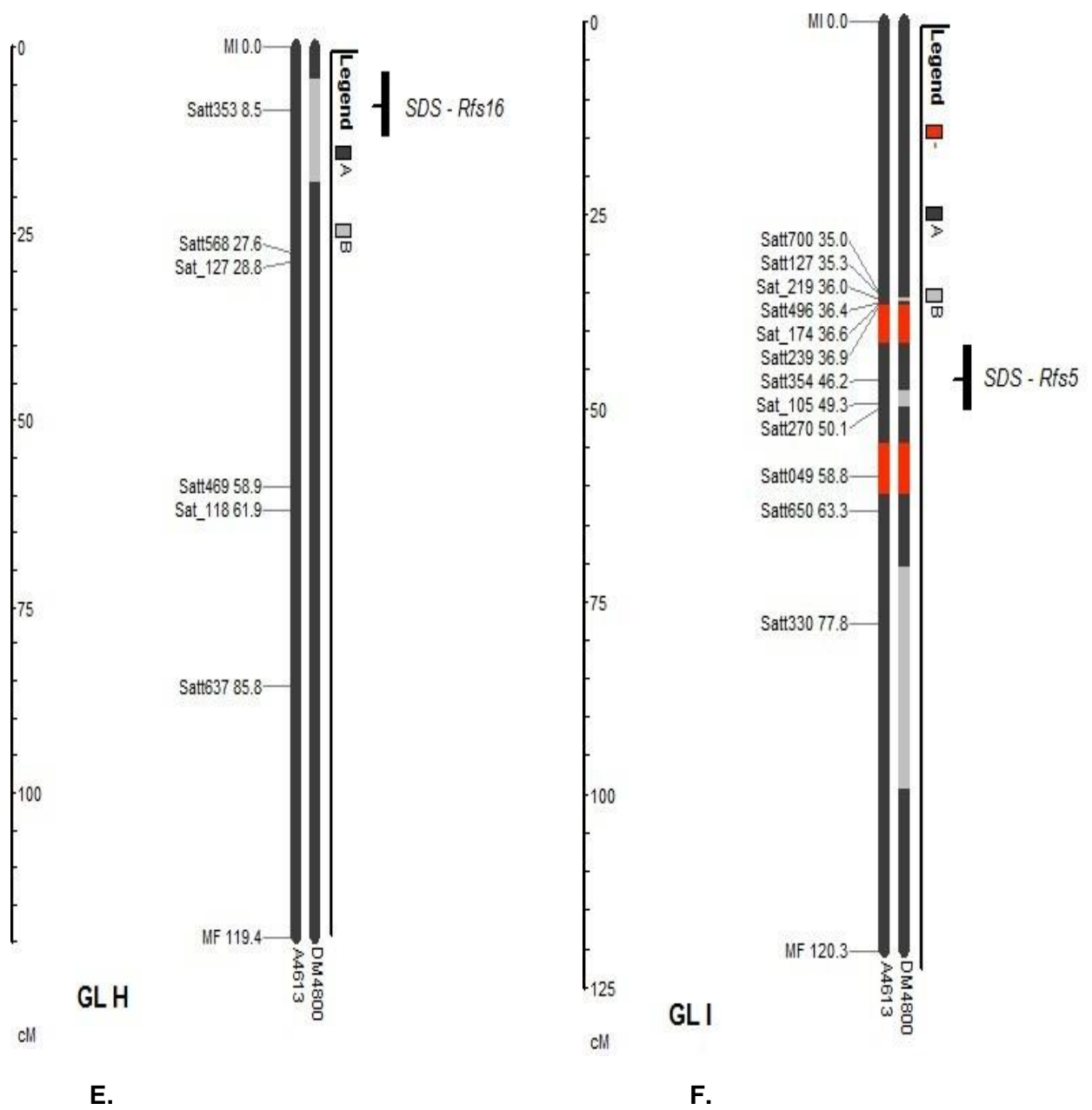
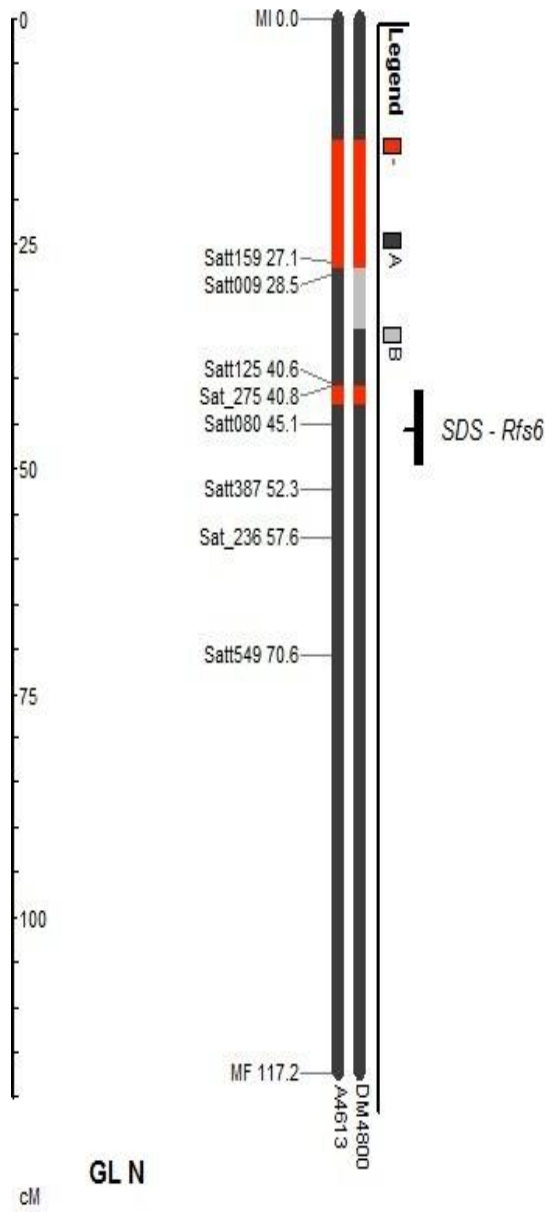


Figura 4 E - F: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento H e I.



G.

Figura 4 G: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en el grupo de ligamiento N.

2.2 Resto del genoma

En este trabajo, además de investigar las regiones genómicas caracterizadas por expresar una respuesta favorable frente a SMS, también se evaluaron los 13 GL restantes del genoma de soja mediante el uso de 85 SSRs.

En la figura 5 se muestra la composición alélica de ambos parentales de la población para todos los MM amplificados en los 13 GL, distribuidos según las distancias en cM establecidas por Song et al. (2004). Por otro lado, en la figura 4 también se muestran los MM amplificados en los siete GL por fuera de las regiones caracterizadas por expresar resistencia frente a SMS.

En el GL A1 fueron analizados dos SSRs separados por 32 cM (figura 5 A), uno de ellos resultó polimórfico entre los parentales de la población, Sat_267, posicionado a 78,40 cM.

En el GL A2 fueron amplificados ocho SSRs en la región delimitada por los SSRs Satt315 posicionado a 45,30 cM y Satt424 ubicado a 60,60 cM; la distancia máxima abarcada por estos MM fue de 15,30 cM, la mínima fue de 0,10 cM y la promedio de 1,91cM (figura 5 B). Ninguno de los MM analizados en dicha región resultó polimórfico entre los parentales.

En el GL B1, de manera aislada fueron amplificados cinco SSRs, de los cuales dos resultaron polimórficos entre los parentales, Satt207 posicionado a 26,50 cM y Satt228 ubicado a 154,10 cM (figura 5 C).

En el GL B2 fueron amplificados tres SSRs en la región abarcada por Satt168 posicionado a 55,20 cM y Satt304 a 65,50 cM (figura 5 D). La distancia máxima comprendida por estos MM fue de 10,30 cM, la mínima fue de 1,80 cM y la distancia promedio fue de 3,43 cM. Los SSRs Satt168 y Satt304 resultaron polimórficos entre los parentales de la población. Además, fue analizado Satt560 posicionado a 97,90 cM, pero resultó monomórfico entre los parentales.

En el GL C1 fueron analizados cinco SSRs de manera aislada (figura 5 E). Uno resultó polimórfico, Satt194, posicionado a 26,40 cM.

En el GL D1b fueron analizados tres SSRs en la región comprendida entre Sat_135 posicionado a 70,70 cM y Satt611 a 74 cM (figura 5 G). La distancia máxima analizada fue de 3,30 cM, la mínima fue de 1,40 cM y la distancia promedio fue de 1,10 cM. Ningún SSR fue polimórfico entre los parentales para esta región. Además, fueron analizados tres SSRs en forma aislada, de los cuales uno resultó polimórfico, Satt172, ubicado a 100,90 cM.

En el GL E fueron analizados cuatro SSRs en la región comprendida por Satt602 posicionado a 41,70 cM y por Sat_273 ubicado a 47,50 cM (figura 5 H). La distancia máxima analizada fue de 5,80 cM, la mínima fue de 1,30 cM y la distancia promedio fue de 1,45 cM. Además, fueron amplificados cuatro SSRs por fuera de esta región. Todos los SSRs fueron monomórficos entre los parentales.

En el GL F fueron analizados cuatro SSRs en la región comprendida por Sat_090 posicionado a 130,60 cM y por Sat_074 a 142,30 cM (figura 4 C). La distancia máxima analizada por estos SSRs fue 11,70 cM, la mínima fue de 0,80 cM y la distancia promedio fue de 2,92 cM, de los cuales ninguno resultó polimórfico entre los parentales. Además, cinco SSRs fueron analizados en el GL, de los cuales uno resultó polimórfico, Satt334 posicionado a 78 cM.

En el GL G fueron amplificados 11 SNPs y dos SSRs en la región comprendida por Satt191 posicionado a 96,60 cM y por BARC- 021603-04153 ubicado a 123,50 cM (figura 4 D). La distancia máxima analizada por los MM fue 26,50 cM, la mínima fue de 0,40 cM y la distancia promedio fue de 2,03 cM. Todos los MM resultaron monomórficos entre los parentales.

En el GL J fueron analizados seis SSRs en la región comprendida por Satt183 posicionado a 42,50 cM y por Sat_366 ubicado a 52,80 cM (figura 5 I). La distancia máxima analizada en esta región fue de 10,30 cM, la mínima fue de 0,10 cM y la distancia promedio fue 1,71 cM. Uno de ellos resultó polimórfico entre los parentales, Sat_0,93 posicionado a 46,10 cM. Además, fueron analizados tres SSRs en el GL, de los cuales dos resultaron polimórficos entre los parentales, Satt285 ubicado a 21,50 cM, que fue analizado en un gel de agarosa, como se muestra en la figura 6 y Satt547 posicionado a 67,80 cM.

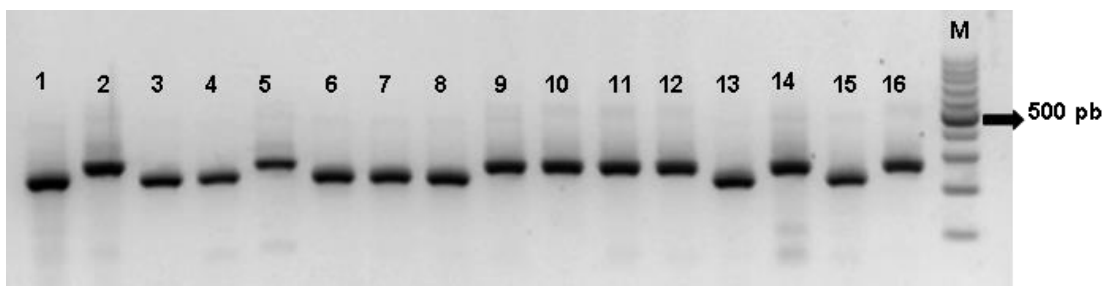


Figura 6: Separación de los productos de amplificación con el marcador Satt285. 1: A4613; 2: DM4800; 3: Ril 1; 4: Ril 2; 5: Ril 3; 6: Ril 4; 7: Ril 5; 8: Ril 6; 9: Ril 7; 10: Ril 8; 11: Ril 9; 12: Ril 10; 13: Ril 11; 14: Ril 12; 15: Ril 13; 16: Ril 14. M: marcador peso molecular 100pb.

En el GL M fueron analizados tres SSRs en forma aislada (figura 5 L), uno de ellos resultó polimórfico, Satt697, posicionado a 85,30 cM.

En el GL O (figura 5 M), fue amplificado un SSR, Satt478, ubicado a 71,10 cM, resultando polimórfico entre los parentales de la población.

En los GL B1 (figura 5 C), C2 (figura 4 A), D1a (figura 5 F) y H (figura 4 E) fueron amplificados un total de 16 SSRs. Todos resultaron monomórficos entre los parentales de la población.

En el resto del genoma se observó un 4,54 % de datos perdidos por inconvenientes en la amplificación (color rojo en los mapas de la figura 5).

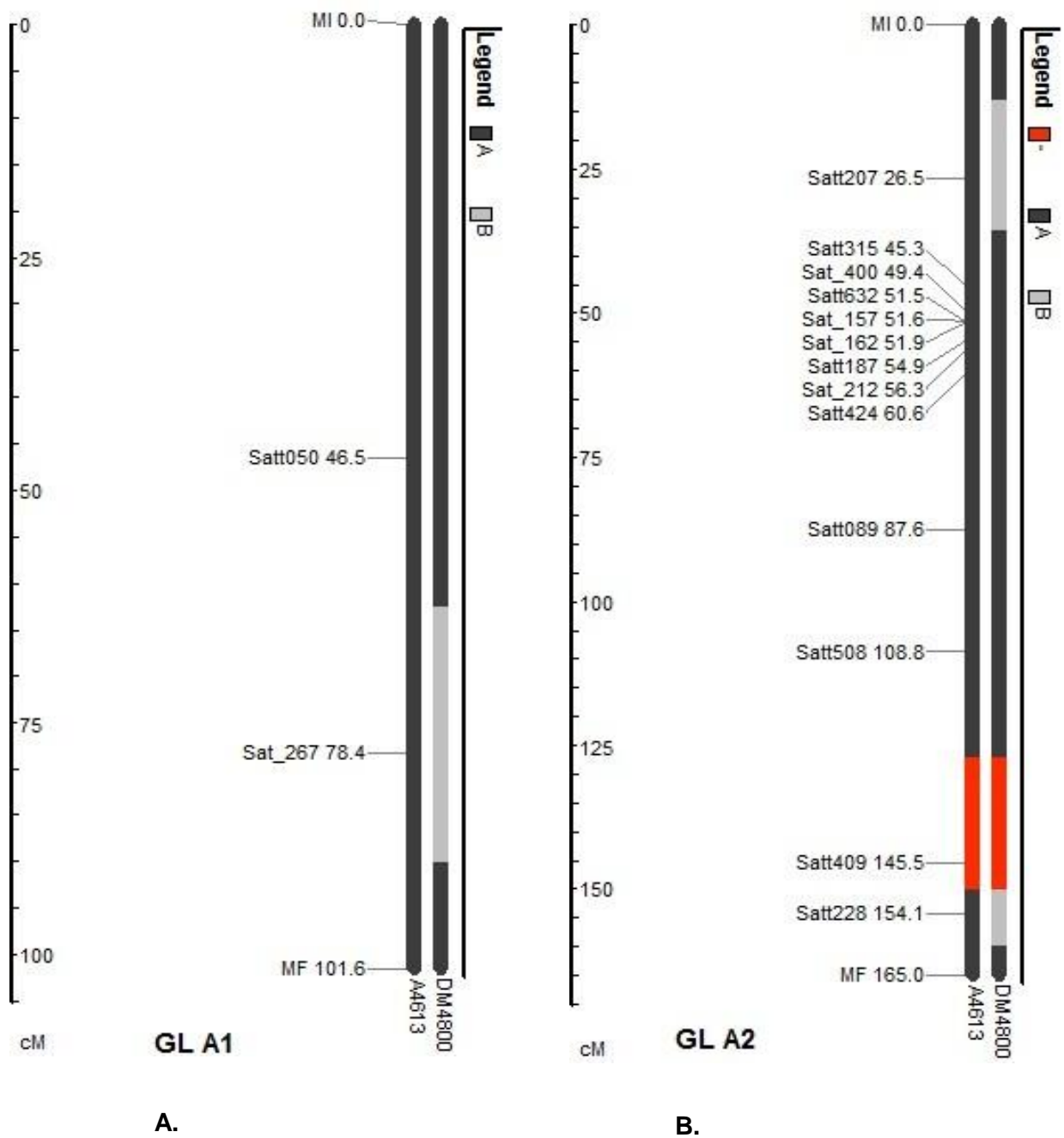
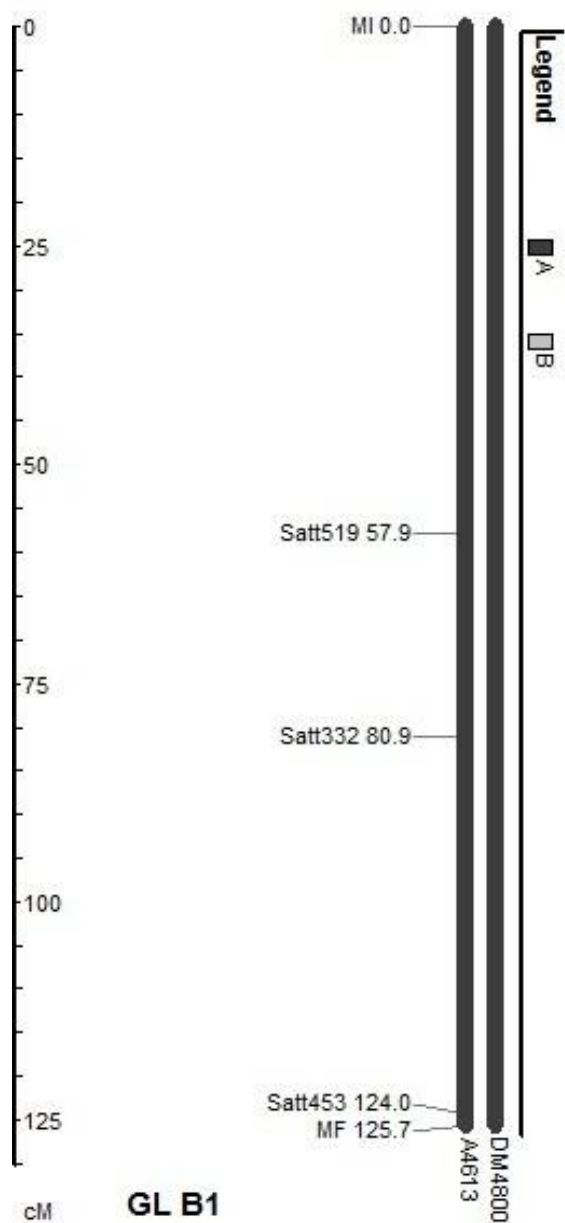
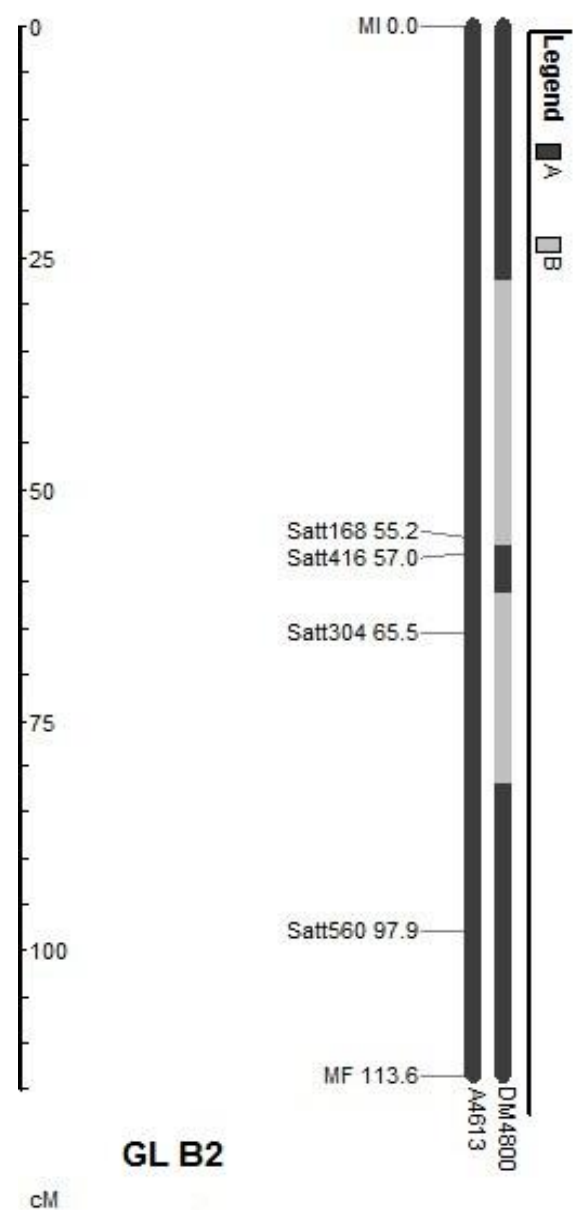


Figura 5 A - B: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento A1 y A2.

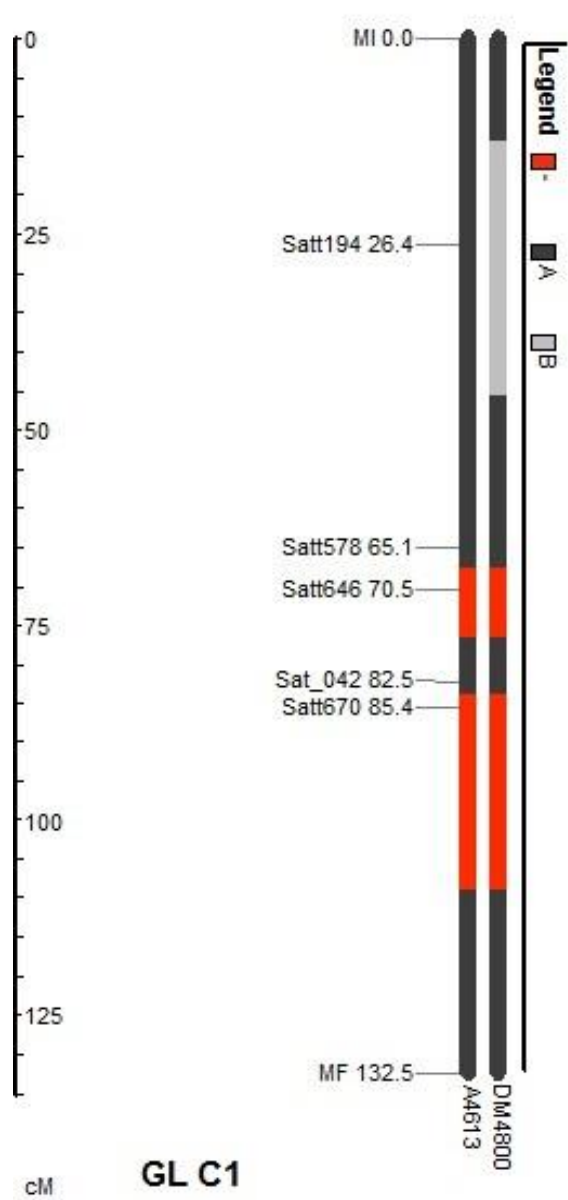


C.

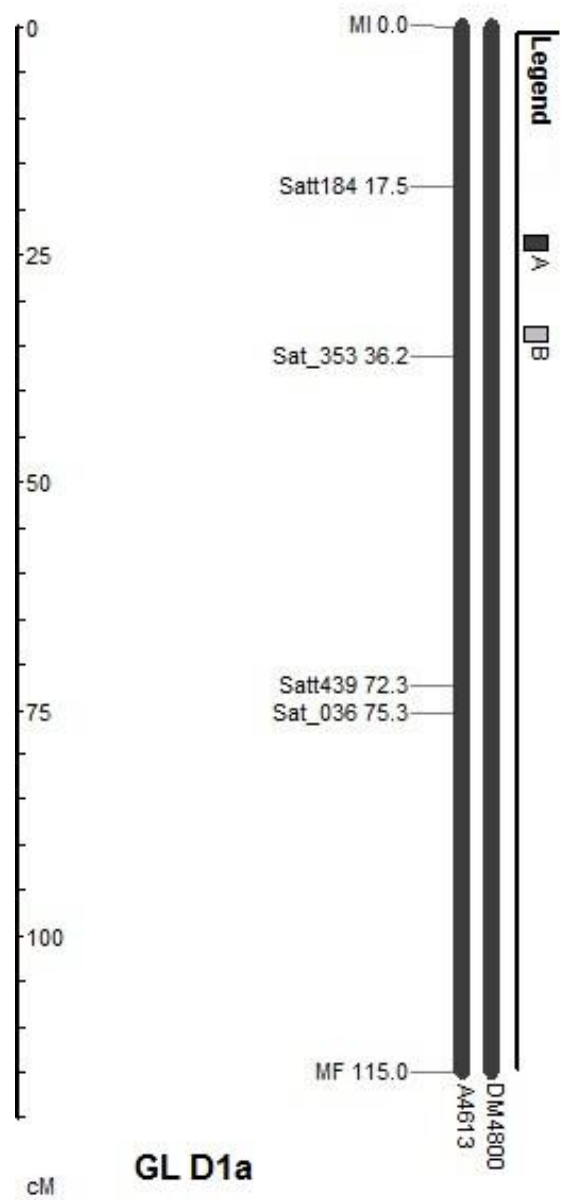


D.

Figura 5 C - D: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento B1 y B2.

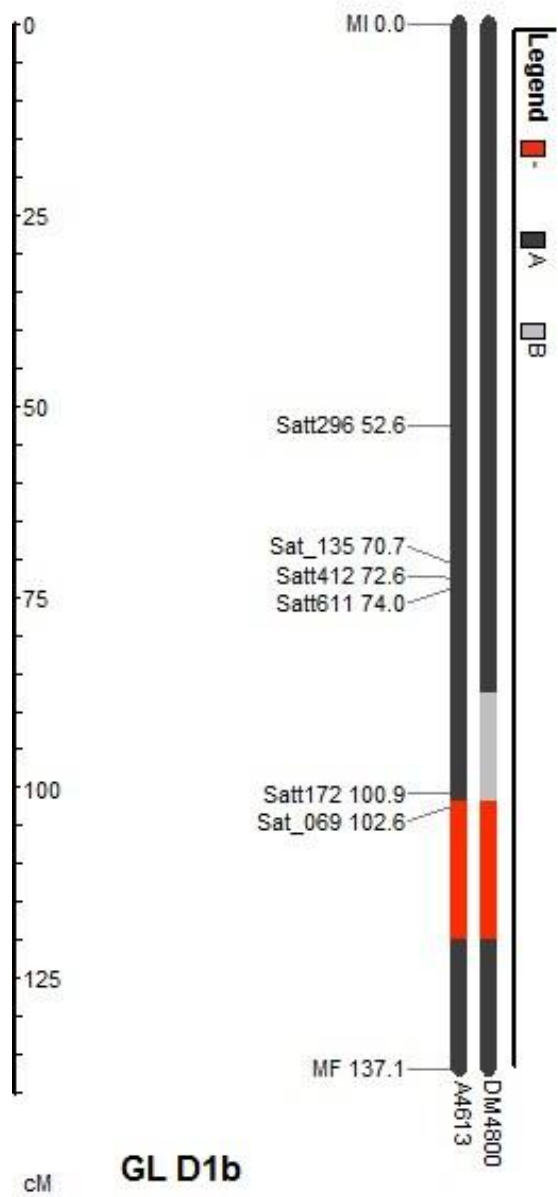


E.

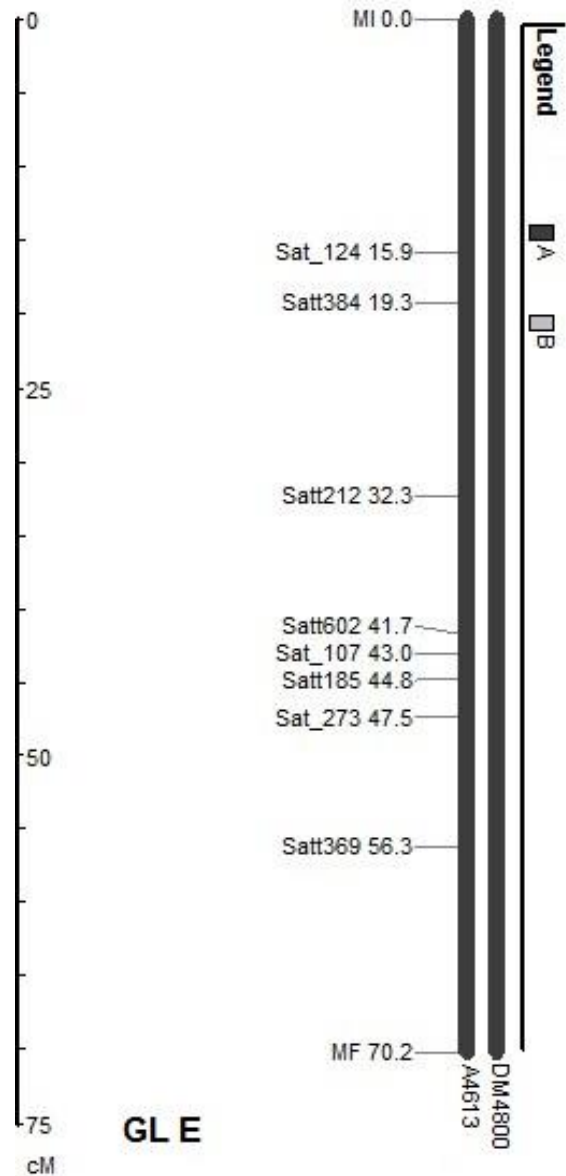


F.

Figura 5 E - F: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento C1 y D1a.



G.



H.

Figura 5 G - H: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento D1b y E.

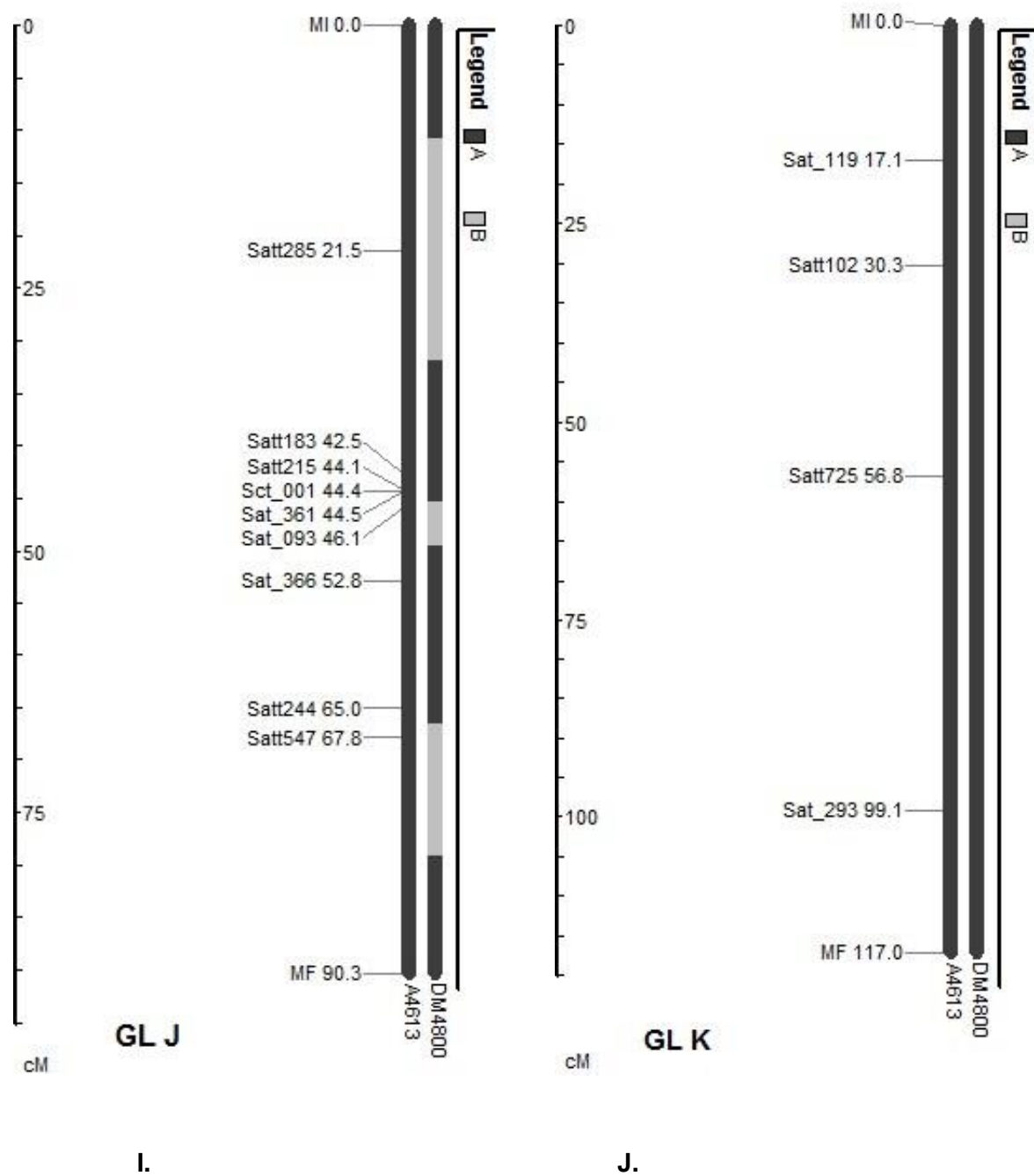


Figura 5 I - J: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento J y K.

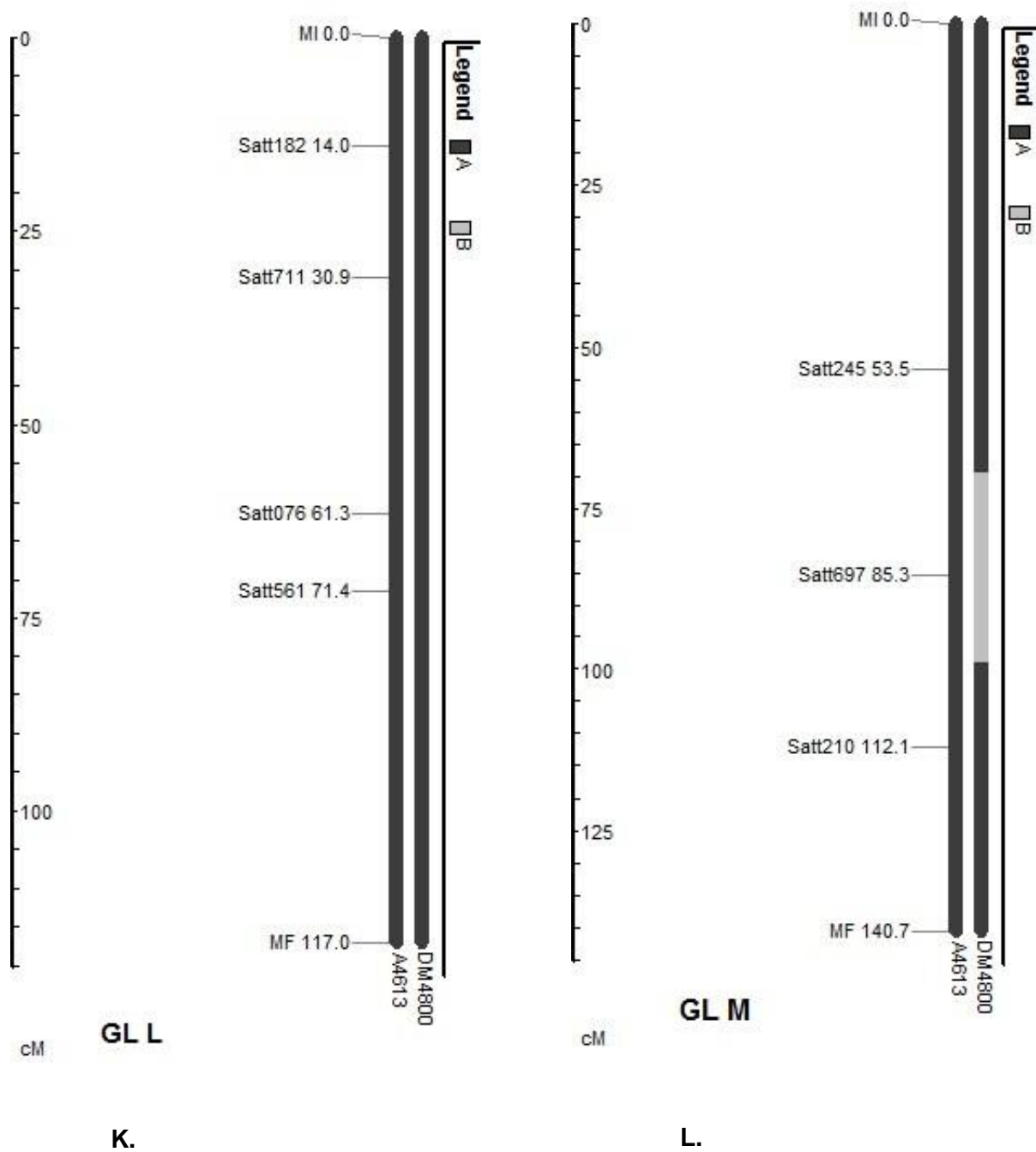
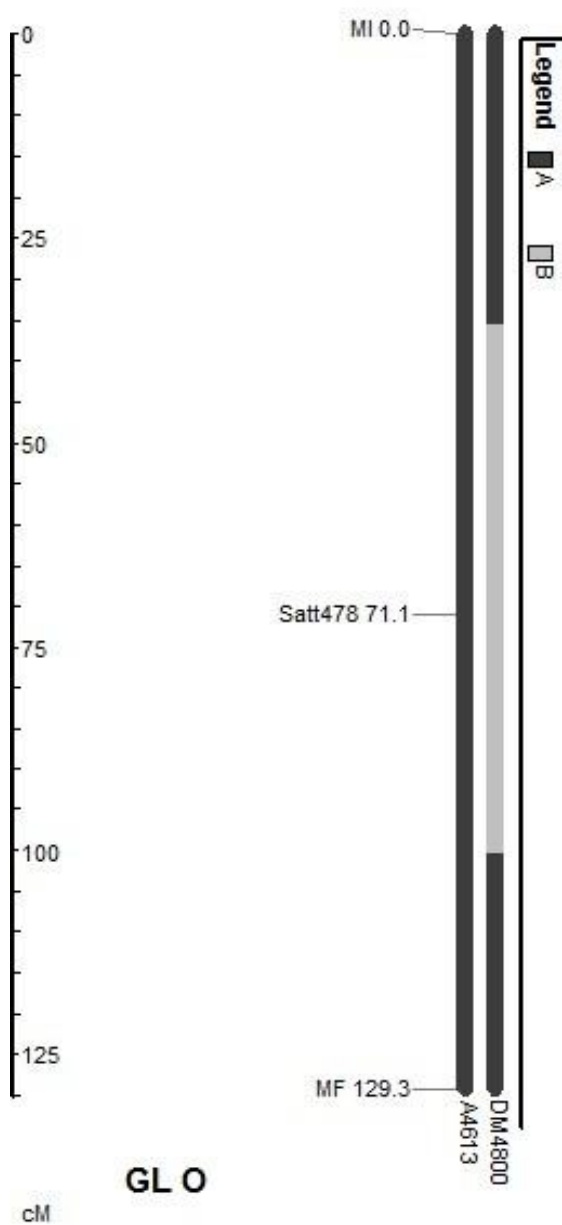


Figura 5 K - L: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en los grupos de ligamiento L y M.



M.

Figura 5 M: Marcadores moleculares amplificados en los parentales NA4613RG y ADM4800 de la población de RILs distribuidos en el grupo de ligamiento O.

3. Segregación de los SSRs en la población de RILs

Los 25 MM polimórficos detectados entre los progenitores fueron analizados en las 149 RILs. En la tabla 11 se presentan los valores de Chi – cuadrado observados considerando las proporciones de segregación esperadas (1:1) para esta población.

Los MM analizados segregaron acorde a lo esperado para esta población de RILs, excepto, Satt304 del GL B2, Sat_168 del GL G, Satt353 del GL H, Satt285 y Satt547 del GL J, cuya segregación fue distorsionada ($p = 0,01$).

Tabla 11: Resultados del Test Chi-cuadrado para marcadores moleculares polimórficos.

MM	GL	Posición	$\chi^2_{0,95, 1}$	p asociado
Sat_267	A1	78,44	0,17	0,68
Satt207	A2	26,50	0,55	0,46
Satt228	A2	154,11	0,07	0,80
Satt168	B2	55,20	0,01	0,92
Satt304	B2	65,55	6,41	0,01
Satt194	C1	26,35	1,51	0,22
Satt371	C2	145,48	0,06	0,80
Satt172	D1b	100,88	0,06	0,80
Satt145	F	10,65	0,01	0,92
Satt160	F	33,18	0,07	0,80
Satt334	F	78,05	0,13	0,71
Sat_210	G	3,70	2,41	0,08
Sat_168	G	3,90	7,95	0,01
Satt309	G	4,53	2,41	0,08
Satt688	G	12,54	0,33	0,50
Satt353	H	8,48	5,61	0,01
Sat_219	I	36,02	0,05	0,82
Sat_105	I	49,34	0,33	0,50
Satt330	I	77,83	0,27	0,61
Satt285	J	21,51	7,27	0,01
Sat_093	J	46,09	2,91	0,08
Satt547	J	67,79	7,27	0,01
Satt697	M	85,34	0,03	0,88
Satt009	N	28,52	0,81	0,36
Satt478	O	71,09	3,21	0,07

MM: marcador molecular; GL: grupo de ligamiento; χ^2 : Test chi - cuadrado

4. Análisis de Marcador Individual

Se utilizó la técnica de ANOVA para detectar cuáles de los MM polimórficos encontrados en el genoma tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre el carácter IE, estos resultados se presentan en la tabla 12.

4.1 Regiones candidatas

Los MM Satt371 del GL C2, Satt145 del GL F y Sat_219 del GL I presentaron asociación significativa con el IE expresando valores de $R = 9\%$, mientras que, los MM, Sat_210, Sat_168 y Satt309 del GL G fueron asociados de manera significativa al IE con valores de $R = 10\%$.

4.2 Resto del genoma

Los MM Satt304 del GL B2 y Satt285 del GL J se asociaron de manera significativa con el IE expresando valores de $R = 9\%$. Por otro lado, Satt547 del GL J, ubicado a 46 cM de Satt285 fue asociado al IE de manera significativa con un valor de $R = 8\%$.

Tabla 12: Asociación ($p \leq 0,05$) entre la región genómica de los grupos de ligamiento (GL) B2, F, G, I y J con índice de enfermedad (IE)

MM	GL	Posición	F	p	R ²
Sat_267	A1	78,44	2,31	0,129	
Satt207	A2	26,5	3	0,0837	
Satt228	A2	154,11	0,15	0,2833	
Satt168	B2	55,2	3,15	0,076	
Satt304	B2	65,55	13,81	0,0002	9%
Satt194	C1	26,35	0,13	0,7161	
Satt371	C2	145,48	39,06	<0,0001	9%
Satt172	D1b	100,88	2,05	0,1525	
Satt145	F	10,65	9,52	0,0021	9%
Satt160	F	33,18	0,33	0,5652	
Satt334	F	78,05	6,96	0,0084	
Sat_210	G	3,7	27,83	<0,0001	10%
Sat_168	G	3,9	31,02	<0,0001	10%
Satt309	G	4,53	31,02	<0,0001	10%
Satt688	G	12,54	0,17	0,6758	
Satt353	H	8,48	0,88	0,3495	
Sat_219	I	36,02	16,37	0,0001	9%
Sat_105	I	49,34	2,89	0,0894	
Satt330	I	77,83	0,22	0,6362	
Satt285	J	21,51	21,85	<0,0001	9%
Sat_093	J	46,09	0,0017	0,9672	
Satt547	J	67,79	4,41	0,0359	8%
Satt697	M	85,34	0,0044	0,947	
Satt009	N	28,52	0,0037	0,9518	
Satt478	O	71,09	0,68	0,4104	

MM= marcador molecular; GL= grupo de ligamiento; R²= Coeficiente de determinación

DISCUSIÓN

1. Caracterización fenotípica

1.1 Análisis de parentales

La elección de estos cultivares comerciales como progenitores para el desarrollo de la población de RILs se realizó considerando resultados previos aportados por Lenzi et al. (2005) y confirmados por resultados obtenidos en este trabajo durante las cuatro campañas agrícolas evaluadas. La variación en las condiciones ambientales que aportaron las diferentes campañas estudiadas fue representativa de esta región agroecológica y los datos logrados fueron consistentes y permitieron entender la interacción entre el hongo, el genotipo y el ambiente.

En este trabajo se priorizó el estudio de la variabilidad del IE expresada en el germoplasma comercial argentino, utilizando los cultivares ADM4800 y NA4613RG como progenitores de la población de RILs. Esta estrategia permitió analizar toda la variabilidad para la respuesta al SMS, ya que, ambos genotipos fueron los más contrastantes para el IE de todos los genotipos de GM adaptados a esta región agroecológica; expresando una variación máxima de IE= 19,2 durante la campaña 2012/13.

Esta variación del IE es significativa en términos de rendimiento de grano, ya que, se conoce que el rendimiento de granos y el IE presentan un coeficiente de correlación negativo, disminuyendo 7% el rendimiento cada 10% de incremento de IE (Chong et al., 2005). Brzostowski et al. 2014, confirmaron dicha correlación en una evaluación de cultivares de soja frente a SMS (*F. virguliforme*) en diferentes ambientes. En Argentina, existen antecedentes de pérdidas de hasta un 10 % de rendimiento en lotes de producción del sudeste de la provincia de Córdoba (Lenzi et al., 2007). Además, Colletto et al. 2008 analizaron la variedad A6445 RG y observaron una reducción del 7% en el peso de 1000 semillas y una disminución de rendimiento por planta del 60% en un cultivar precoz.

Por otro lado, a nivel mundial se realizaron estudios que abarcan un mayor rango de variabilidad del IE, principalmente por la presencia de genotipos que expresan valores de IE mayores (Njiti et al., 1998; Farias Neto et al., 2007; Kassem et al., 2007; Kazi et al., 2008;

Gianmaria et al., 2014; Anderson et al., 2015). Este hecho también ocurre para las condiciones agroecológicas de Argentina cuando se analiza germoplasma exótico no mejorado, o genotipos con ciclos muy largos por efecto de la interacción entre GM y latitud en la cual se realiza la siembra. Esto demuestra que el germoplasma comercial argentino presenta cierto grado de mejora para este carácter, el cual se expresa cuando se utilizan genotipos de GM correctos para cada latitud.

La menor variación en los valores de IE fue observada en la campaña 2014 - 2015. Es posible que el exceso de agua en el suelo haya generado condiciones desfavorables para el patógeno y favorable para el cultivo, por ausencia de stress hídrico, siendo este, un factor que puede afectar las defensas de las plantas, facilitando la infección y el desarrollo de la enfermedad, cuando se produce en periodos críticos para las plantas (Lenzi et al., 2015).

Considerando la variabilidad del IE detectada para el germoplasma comercial argentino, se considera que este carácter podría ser incorporado a genotipos susceptibles, aportando estabilidad a la ganancia genética lograda para el rendimiento de granos durante las últimas décadas en Argentina.

1.2 Análisis de RILs

La respuesta al SMS es un carácter poligénico y sensible a las condiciones ambientales, este hecho podría dificultar la detección de los “verdaderos” genotipos resistentes debido a la expresión de bajos valores de IE por condiciones ambientales desfavorables para la infección, es por esto que los valores de IE deben considerarse en forma relativa y no en forma absoluta, ya que con condiciones más o menos favorables para la enfermedad pueden variar en forma importante (Lenzi et al., 2012). En este trabajo los experimentos fueron realizados en condiciones ambientales muy diversas, debido a que las campañas agrícolas se caracterizaron por condiciones normales para el cultivo durante todo el ciclo, hasta estrés hídrico y térmico en diferentes estadios fenológicos y exceso de agua y efecto de napas freáticas. Además, la infección histórica con *Fusarium* en el campo experimental donde se realizaron los ensayos y la inoculación artificial realizada en el surco de siembra, permitieron establecer un diseño experimental homogéneo para la disponibilidad de inóculo.

Los histogramas de frecuencias de las RILs para las cuatro campañas agrícolas mostraron que la variación máxima del IE entre estas fue menor a la variación máxima del IE

entre los progenitores. Por otro lado, las RILs más frecuentes presentaron IE menores y las menos frecuentes IE mayores, lo cual implica que la recombinación genética entre ADM4800 y NA4613RG, favoreció la respuesta al SMS respecto al genotipo susceptible NA4613RG.

La magnitud de la variancia entre las distintas condiciones ambientales de cada campaña agrícola fue calculada a través de ANOVA, y expresó un efecto altamente significativo ($p < 0,001$), confirmando la diversidad ambiental a la que fueron sometidas las RILs.

El ANOVA, además, detectó un efecto significativo de la interacción RILs * Campaña ($p \leq 0,05$), debido a que el IE de algunas RILs fue menor en ciertas condiciones y mayor en otras, presentando un comportamiento inestable entre campañas agrícolas. Este efecto permitiría la elección de genotipos falsos resistentes si no se diseñan experimentos adecuados. Según Gibson et al. (1994), un año de evaluación puede ser suficiente para identificar genotipos susceptibles, pero es necesario al menos tres años de evaluación para considerar que un genotipo presenta buen comportamiento frente al SMS.

El análisis de estabilidad de RILs realizado a través del test de Shukla mostró que solamente 12 RILs presentaron un comportamiento inestable, mientras que, el resto fueron estables en todos los ambientes, con valores de IE superiores o inferiores a la media general.

Este resultado sugirió que el carácter IE no presentó una interacción de gran magnitud con el ambiente, al menos para las condiciones ambientales estudiadas en este trabajo, lo cual indica que se podrían utilizar menos campañas agrícolas de evaluación para la selección de genotipos realmente resistentes, facilitando el estudio de mapeo genético y selección de líneas experimentales en mejoramiento.

El efecto estadísticamente significativo ($p < 0,001$) aportado por las diferencias entre RILs, coincide con las mínimas diferencias agronómicas necesarias para mejorar el IE a través de la selección de las mejores RILs. En el test de Shukla se observó que ocho RILs fueron estables y con menores valores de IE que el parental ADM4800. Además, estos genotipos aportaron mayor variabilidad al IE, incrementando el rango de selección para el mejoramiento genético y aportando nuevas combinaciones de genes que podrían ser detectadas por estudios de mapeo genético.

1.3 Componentes de Varianza

Los componentes de la varianza se utilizaron para el cálculo de la heredabilidad en sentido amplio según Nyquist y Baker (1991) teniendo en cuenta las campañas de evaluación, la interacción RILs * Campañas, el número de repeticiones y el número de RILs. La heredabilidad obtenida, fue considerada alta según la clasificación de Stanfield (1971), este resultado coincide con la baja interacción con el ambiente detectada para las condiciones estudiadas en este trabajo.

El valor de heredabilidad estimada fue levemente inferior al publicado por otros autores, como es el caso de Hnetkovsky et al. (1996) y Njiti et al. (1997), quienes obtuvieron heredabilidades entre 0,66 y 0,88 para evaluaciones de IE a campo utilizando una población de RILs proveniente de Essex x Forrest y Pyramid x Douglas, respectivamente. Mientras que, Anderson et al. (2015) obtuvo una heredabilidad de 0,20 cuando evaluó el IE a campo en una población de RILs proveniente de la cruce MD 96-5722 x Spencer.

Por otro lado, en trabajos realizados en invernáculo, Njiti et al. (2001) calculó valores de heredabilidad entre 0,33 y 0,66, menores a los esperados para este tipo de experimentos controlados.

2. Caracterización molecular

En este trabajo los parentales de la población fueron elegidos con el fin de estudiar la respuesta al SMS en germoplasma comercial. Si bien estos dos genotipos representan la máxima variación de la respuesta al SMS para cultivares argentinos de GM IV, se evidenció que presentan polimorfismo a nivel molecular reducido. Es posible que por ser cultivares argentinos, contemporáneos y del mismo GM, compartan gran parte del genoma, es decir que podrían tener ancestros en común.

Se conoce, que la variación genética entre cultivares de soja es baja, por lo que un fragmento polimórfico mapeado en una población puede no segregar en otra (Cregan et al., 1999).

A nivel molecular la variabilidad observada en este trabajo fue de 12,5%, inferior al 36% hallado por Maughan et al. (1996) cuando compararon genotipos de soja exóticos y cultivares utilizando MM AFLP. Además, Thompson et al. (1998) obtuvieron resultados

similares utilizando MM RAPD. En cambio, Narvel et al. (2000) encontraron mayor polimorfismo cuando estudiaron 79 genotipos de soja, entre ellos cultivares y exóticos, con 74 SSRs. Del total de loci, 72 fueron polimórficos (97%). Es importante notar la habilidad de los SSRs para detectar fragmentos diferentes entre sets de genotipos, en comparación a otros sistemas de marcadores. Si bien en este trabajo fueron utilizados también SNPs todos resultaron monomórficos. Este tipo de marcadores son muy utilizados en la actualidad para realizar estudios de mapeo por su alta frecuencia de distribución.

2.1 Regiones Candidatas

Un total de 136 MM distribuidos en los siete GL permitieron cubrir cada QTL de resistencia previamente identificado. En total fueron caracterizados 279,87 cM, con una distancia promedio entre MM de 3,85 cM.

Algunos autores (Darvasi et al.,1993) determinaron que la distancia máxima entre MM para el mapeo genético debe ser de 5 cM, con lo cual se minimiza la posibilidad de obtener individuos dobles recombinantes entre MM y los genes de interés. En este trabajo, las regiones genómicas estudiadas fueron saturadas de forma correcta, con lo cual se considera poco probable que ocurran dos eventos de recombinación entre cualquiera de los MM amplificados.

Sin embargo, la potencia para detectar ligamientos de este diseño experimental no fue acompañada por polimorfismo entre los parentales de la población. En este sentido, solo trece SSRs fueron polimórficos, lo cual implica que podrían existir eventos de recombinación entre genes relacionados con la respuesta al SMS que no fueron detectados.

En este trabajo, la caracterización molecular de las regiones genómicas estudiadas mostró un bajo polimorfismo entre los parentales en relación con la cantidad de MM analizados. Este hecho indicó que ambos parentales son muy semejantes en cuanto a su composición molecular.

Si bien la similitud molecular no implica que los parentales posean la misma composición genética, este es un fuerte indicador de que la base genética de ambos genotipos es semejante. Considerando que los SSRs son herramientas moleculares muy efectivas para detectar polimorfismo, que ambos parentales son cultivares comerciales argentinos

contemporáneos y del mismo GM, se podría esperar que ambos posean ancestros en común.

Si ambos genotipos están emparentados, las similitudes moleculares podrían ser también similitudes en la composición de los genes siendo las regiones polimórficas las responsables de la expresión de toda la variabilidad genética detectada en la respuesta al SMS en esta población de RILs.

2.2 Resto del genoma

Un total de 85 SSRs fueron analizados en los 13 GL para caracterizar el resto del genoma, de los cuales 37 se agruparon en seis regiones genómicas, mientras que, el resto de los MM se localizaron de forma aislada en los diferentes GL. En total fueron caracterizados 71,50 cM para estas regiones del genoma, con una distancia promedio entre MM de 1,94 cM. Un total de 12 MM fueron polimórficos entre los parentales de la población, de los cuales, tres se localizaron en las regiones genómicas descritas y nueve de forma aislada en los GL.

La caracterización molecular del resto del genoma también mostró un bajo polimorfismo entre los parentales en relación con la cantidad de MM analizados. Este hecho confirma la similitud en la composición molecular de los progenitores de la población encontrada para las regiones genómicas caracterizadas por expresar una respuesta favorable frente a SMS.

3. *Análisis de Marcador Individual*

Si bien fue bajo el polimorfismo detectado entre los progenitores de la población, el análisis de marcador individual permitió identificar nueve regiones del genoma de soja asociadas al IE, cuyos coeficientes de determinación variaron de 8 a 10% y explicaron un importante porcentaje de la variación fenotípica.

Los QTLs hallados en este análisis coinciden con los encontrados en estudios previos (Hnetkovsky et al., 1996; Iqbal et al., 2001; Njiti et al., 2002; Kazi et al., 2008; Kassem et al., 2012; Njiti et al., 2002; Triwitayakorn et al., 2005; Chang et al., 1996; Njiti et al., 2002; Kazi et al., 2008) donde se utilizaron métodos de mapeo como, mapeo por Intervalo, mapeo por Intervalo compuesto y no análisis de marcador individual, además de diferentes tipos de marcadores moleculares y diferentes poblaciones analizadas bajo condiciones de

invernáculo (Njiti et al., 2001) o de campo en diferentes latitudes (Njiti et al., 2002; Farias Neto et al., 2007; Kazi et al., 2008; Kassem et al., 2012).

En este análisis, el IE fue asociado a Satt371 del GL C2, el cual fue descrito también en otras fuentes de resistencia (Hnetkovsky et al., 1996; Iqbal et al., 2001; Njiti et al., 2002; Kazi et al., 2008; Kassem et al., 2012). Por otro lado, Satt309 del GL G fue asociado al IE, descrito en otras poblaciones (Njiti et al., 2002; Triwitayakorn et al., 2005). Además, Satt145 del GL F fue asociado al IE, el cual se encuentra a 22,5 cM de Satt160, descrito en otras fuentes de resistencia por Kassem et al. (2006). En el GL I, Sat_219 fue asociado al IE, este se posiciona a 10 cM de Satt354, QTL determinado por Iqbal et al. (2001). Mientras que, en el GL G, fueron detectados Sat_210 y Sat_168 asociados al IE, a una distancia de 1,2 y 1,4 cM, respectivamente del QTL identificado por Satt163 en otras fuentes de resistencia (Chang et al., 1996; Njiti et al., 2002; Kazi et al., 2008). Por último, los SSRs Satt304 del GL B2, Satt285 y Satt547 del GL J asociados al IE, hallados en este análisis, no fueron asociados al IE con anterioridad en otras fuentes de resistencia.

Los QTLs hallados en este análisis proveen resistencia al SMS causado por *F. tucumaniae* y coinciden con los QTLs mapeados en otras poblaciones, pero caracterizados por la resistencia a SMS causado por *F. virguliforme*.

CONCLUSIONES

- ✓ Los cultivares comerciales ADM4800 y NA4613RG utilizados como progenitores de la población de RILs expresaron la máxima variabilidad de la respuesta al SMS para los GM adaptados a la región agroecológica donde fueron desarrollados los experimentos.
- ✓ El IE presentó la misma distribución de frecuencias para la población de RILs para todas las campañas agrícolas, lo que determinó un comportamiento estable del carácter.
- ✓ El análisis de estabilidad demostró que sólo 12 RILs presentaron un comportamiento inestable entre campañas agrícolas, lo que determinó una baja interacción del IE con el ambiente. Entonces, para un diseño experimental como el propuesto en este trabajo, fueron suficientes menos de cuatro campañas agrícolas para la selección de genotipos resistentes.
- ✓ Ocho RILs expresaron un IE menor que el cultivar ADM4800 y aportaron mayor variabilidad al IE, por lo que se incrementó el rango de selección para el mejoramiento genético.
- ✓ La similitud molecular de los progenitores, la posible relación de parentesco entre ellos, pudieron ser las causas de una composición genética similar, por lo que, las regiones polimórficas detectadas serían las responsables de la expresión de la variabilidad genética en la respuesta al SMS en la población de RILs.
- ✓ Nueve SSRs fueron asociados al IE en la población de RILs y explicaron un porcentaje alto de la variabilidad fenotípica del carácter. Estos QTLs proveyeron resistencia al SMS causado por *F. tucumaniae*, seis de ellos coincidieron con QTLs mapeados en otras poblaciones, pero caracterizados por la resistencia al SMS causado por *F. virguliforme*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). Introduction to plant Pathology. Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam. Pp.: 127 – 129.
- Anderson, J.; Akond, M.; Kassem, M. A.; Meksem, K.; Kantartzi, S. K. (2015). Quantitative trait loci underlying resistance to sudden death syndrome (SDS) in MD96-5722 by “Spencer” recombinant inbred line population of soybean. *Biotech* 5 (2): 203 – 210.
- Aoki, T.; O'Donnell, K.; Scandiani, M. M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium virguliforme*. *Mycoscience* 46: 162 - 183.
- Aoki, T.; Scandiani, M. M.; O'Donnell, K. (2012). Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience* 53: 167 – 186.
- Applied Biosystems by Life Technologies. HRM Experiments Using MeltDoctor™ HRM Reagents and High-Resolution Melt Software v3.0, User Guide. Part Number 4457847 Rev. B., Life Technologies.
- Brzostowski, L. F.; Schapaugh, W. T.; Rzedkiewicz, P. A. (2014). Effect of Host Resistance to *Fusarium virguliforme* and *Heterodera glycines* on Sudden Death Syndrome Disease Severity and Soybean Yield, *15* (1), 1–8.
- Chang, S. J. C.; Doubler, T. W.; Kilo, V.; Suttner, V.; Klein, J.; Schmidt, M. E.; Gibson, P. T.; Lightfoot, D. A. (1996). Two Additional Loci underlying Durable Field Resistance to Soybean Sudden Death Syndrome (SDS). *Crop Sci.* 36: 1684 - 1688.
- Chaves, L. J. (2001). Interação de genótipos com ambientes. Recursos genéticos e melhoramento - Planta. Rondonópolis: Fundação MT. Pp.: 673 – 713.

- Chong, S. K.; Hildebrand, K. K.; Luo, Y.; Myers, O.; Indorante, S. J.; Kazakevicius, A.; Russin, J. (2005). Mapping soybean sudden death syndrome as related to yield and soil/site properties. *Soil and Tillage Research* 84 (1): 101 – 107.
- Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B.; Pang E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142 (1 - 2): 169 - 196.
- Colletto, A.; Luque, A.; Salas, G.; González, V.; Ploper, D.; Ruberti, D.; Biasoli, M.; Scandiani, M. M. (2008). Identificación de cepas de *Fusarium* causantes del síndrome de la muerte súbita de la soja en Tucumán y Salta. *Avance Agroindustrial* 29: 26-30.
- Covert, S.; Aoki, T.; O´Donnell, K.; Starkey, D.; Holliday, A.; Geiser, D. M.; Cheung, F.; Town, A.; Strom, J.; Juba, J.; Scandiani, M. M.; Yang X. B. (2007). Sexual reproduction in the Sudden Death Syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 799-807.
- Cregan, P. B.; Jarvik, T.; Bush, A. L.; Shoemaker, R. C.; Lark, K. G.; Kahler, A. L.; Kaya, N.; VanToai, T. T.; Lohnes, D. G.; Chung, J.; Specht, J. E. (1999). An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. *Crop Sci.* 39: 1464 – 1490.
- Darvasi, A. (1998). Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature genetics* 18 (1): 19 - 24.
- Darvasi, A.; Weinreb, A.; Minke, V.; Weller, J. I.; Soller, M. (1993). Detecting marker - QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134: 943 - 951.
- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Distéfano, S.; Gadbán, L. (2006). Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2005 - 2006. Soja actualización 2006. Informe de Actualización Técnica N° 3. Marcos Juárez Argentina. INTA EEA.

- Distéfano, S.; Lenzi, L.; Gadbán, L. (2016). Panorama fitopatológico del cultivo de soja en el sudeste de Córdoba. En: Informe de Actualización Técnica N°6. INTA Ediciones. Pp.: 4 - 5.
- Falconer, D. S. (1984). Introduction to quantitative genetics. Ed.2. Longmans Green, London / New York.
- Farias Neto, A. L.; Hashmi, R.; Schmidt, M.; Carlson, S. R.; Hartman, G. L.; Li, S.; Diers, B. W. (2007). Mapping and confirmation of a new sudden death syndrome resistance QTL on linkage group D2 from the soybean genotypes PI 567374 and "Ripley." Molecular Breeding 20 (1): 53 – 62.
- Fehr, W. (1987). Principles of Cultivar Development. Theory and Technique. McGraw - Hill.
- Gianmaria, S. L.; Rupe, J. C.; Chen, P.; Mozzoni, L. A. (2014). Genetic Analysis of Resistance to Sudden Death Syndrome Caused by *Fusarium virguliforme* in Hartwig Soybean. Journal of Crop Improvement 28 (6): 758 – 771.
- Gibson, P. T.; Shenaut, M. A.; Suttner, R.J.; Njiti, V. N.; Myers, J. R. O. (1994). Soybean varietal response to sudden death syndrome. In: Wikinson D (ed) Proc 24ht Soybean Seed Res Conf, Washington, D.C.: 20 – 40.
- Giorda, L. (1997). La soja en la Argentina. En: El cultivo de la soja en Argentina. INTA Centro Regional Córdoba.
- Gupta, P. K.; Varshney, R. K.; Sharma, P. C.; Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breed. 118: 369 - 390.
- Hackett, C. A. (2002). Statistical methods for QTL mapping in cereals. Plant Molec. Biol. 48: 585 - 599.
- Hartman, G.; Chang, H. X.; Leandro, L. F. (2015). Research advances and management of soybean sudden death syndrome. Crop Protection 73: 60 – 66.

- Hnetkovsky, N.; Chang, S. C.; Doubler, T. W.; Gibson, P. T.; Lightfoot, D. A. (1996). Genetic mapping of loci underlying field resistance to sudden death syndrome. *Crops Sci.* 36: 392 - 400.
- HRM Experiments Using MeltDoctor™ HRM Reagents and High Resolution Melt Software v3.0 User Guide. Applied Biosystems by life technologies.
- Iqbal, M. J.; Meksem, K.; Njiti, V. N.; Kassem, M. A.; Lightfoot, D. A. (2001). Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden-death syndrome (SDS) in Essex x Forrest RILs. *Theoretical and Applied Genetics* 102 (2–3): 187 – 192.
- Ivancovich, A.; Botta, G.; Annone, J. (1992). Síndrome de la muerte repentina en cultivos de soja en el área de la EEA Pergamino, Carpeta de Producción Vegetal. Información N° 94. Tomo XI, Soja.
- Kassem, M.; Meksem, K.; Wood, A. J.; Lightfoot, D. A. (2007). Loci Underlying SDS and SCN Resistance Mapped in the ‘Essex’ by ‘Forrest’ Soybean Recombinant Inbred Lines. *Reviews in Biology and Biotechnology* 6 (1): 2 – 10.
- Kassem, M.; Ramos, L.; Leandro, L.; Mbofung, G.; Hyten, D. L.; Kantartzi, S. K.; Meksem, K. (2012). The “PI 438489B” by “Hamilton” SNP-Based Genetic Linkage Map of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Identified Quantitative Trait Loci that Underlie Seedling SDS Resistance. *Journal of Plant Genome Sciences* 1(1): 18 – 30.
- Kazi, S.; Shultz, J.; Afzal, J.; Johnson, J.; Njiti, V. N.; Lightfoot, D. A. (2008). Separate loci underlie resistance to root infection and leaf scorch during soybean sudden death syndrome. *Theoretical and Applied Genetics* 116 (7): 967 - 977.
- Kearsey, M. J. y Pooni, H. S. (1996). *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall: London. Pp.: 1 - 381.
- Lander, E. S. y Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199. Corregido en *Genetics* (1994): 136: 705.

- Lenzi, L.; Conde, B.; Fuentes, F.; Distéfano, S.; Gadban, L.; Heredia, A.; Pesaresi, E.; Salines, L. (2015). Comportamiento de cultivares de soja frente al síndrome de la muerte súbita. Campañas 2009/ 10 a 2014/ 15. INTA Ediciones. Pp.: 1 - 10.
- Lenzi, L.; Distéfano, S.; Salines, L. (2005). Comportamiento de cultivares de soja frente al Síndrome de la Muerte Repentina con infestación artificial en condiciones de campo. INTA Ediciones. Pp.: 1 - 3.
- Lenzi, L.; Distéfano S.; Salines L. (2007). Comportamiento de cultivares de soja frente al Síndrome de la Muerte Repentina con infestación artificial en condiciones de campo. Soja actualización 2007. Informe de actualización técnica N° 10. EEA Marcos Juárez INTA.
- Lenzi, L.; Distéfano, S.; Scandiani M. (2007). Estimación de pérdidas de rendimiento asociadas al Síndrome de la muerte repentina durante la campaña 2005/ 06. INTA Ediciones. Pp.: 1 – 4.
- Lenzi, L.; Masiero, B.; Fuentes, F.; Distéfano, S.; Salines, L. (2012). Comportamiento de cultivares de soja frente al Síndrome de la Muerte Súbita. Campañas 2006 / 07 a 2011 / 12. INTA Ediciones. Pp.: 1 – 10.
- Lightfoot, D. A.; Njiti, V. N.; Gibson, P. T.; Kassem, M. A.; Iqbal, J. M.; Meksem, K. (2005). Registration of Essex x Forrest recombinant inbred line (RIL) mapping population. *Crop Sci.* 45: 1678 – 1681.
- Luckew, A. S.; Leandro, L. F.; Bhattacharyya, M. K.; Nordman, D. J.; Lightfoot, D. A.; Cianzio, S. R. (2013). Usefulness of 10 genomic regions in soybean associated with sudden death syndrome resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 126 (9): 2391 – 2403.
- Mansur, L. M.; Orf, J. H.; Chase, K.; Jarvik, T.; Cregan, P. B.; Lark, K. G. (1996). Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36: 1327–1336.

- Martínez, M. C.; Helguera, M.; Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. 2010: 70 - 85.
- Masiero, B. y Castellano, S. (1991). Programa para el análisis de la interacción genotipo-ambiente usando el procedimiento IML de SAS. Actas Primer Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística. Valparaíso, Chile.
- Maughan, P. J.; Saghai Maroof, M. A.; Buss, G. R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715 – 723.
- McMillan, I. y Robertson, A. (1974). The power of methods for the detection of major genes affecting quantitative characters. *Heredity* 32: 349 - 356.
- Meksem, K.; Doubler, T. W.; Chanchaoenchai, K.; Njiti, V. N.; Chang, S. J. C.; Rao Arelli, A. P.; Lightfoot, D. A. (1999). Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics* 99 (7 – 8): 1131 – 1142.
- Miles, C. y Wayne, M. (2008). Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1.
- Molina, G. J. D. (1992). Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT Editor México, D. F.
- Morton, N. E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Human Genet.* 3: 277 - 318.
- Nakajima, T.; Mitsueda, T.; Charchar, M. J. D. (1993). Occurrence of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* in Brazil. In: Nelson PE, ed. Seventh International Fusarium Workshop. University Park, PA, USA: Pennsylvania State University Press, 79.
- Nakajima, T.; Mitsueda, T.; Charchar, M. J. D. (1996). First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *Japanese Agricultural Research Quarterly* 30: 31 – 4.

- Narvel, J. M.; Fehr, W. R.; Chu, W. C.; Grant, C.; Shoemaker, R. C. (2000). Simple Sequence Repeat Diversity among Soybean Plant Introductions and Elite Genotypes. *Crop Sci.* 40: 1452 – 1458.
- Njiti, V. N.; Doubler, T. W.; Suttner, R. J.; Gray, L. E.; Gibson, P. T.; Lightfoot, D. A. (1998). Resistance to soybean sudden death syndrome and root colonization by *Fusarium solani f. sp. glycine* in near-isogenic lines. *Crop Sci.* 38 (2): 472 – 477.
- Njiti, V. N.; Johnson, J. E.; Torto, T. A.; Gray, L. E.; Lightfoot, D. A. (2001). Inoculum Rate Influences Selection for Field Resistance to Soybean Sudden Death Syndrome in the Greenhouse. *Crops Sci.* 41: 1726 – 1731.
- Njiti, V. N.; Meksem, K.; Iqbal, M. J.; Johnson, J. E.; Kassem, M. A.; Zobrist, K. F.; Lightfoot, D. A. (2002). Common loci underlie field resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas. *Theoretical and Applied Genetics* 104 (2 – 3): 294 – 300.
- Njiti, V. N.; Shenaut, M. A.; Suttner, R. J.; Schmidt, M. E.; Gibson, P. T. (1996). Soybean response to soybean sudden death syndrome: inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. *Crop Sci.* 36: 1165 - 1170.
- Njiti, V. N.; Suttner, R. J.; Gray, L. E.; Gibson, P. T.; Lightfoot, D. A. (1997). Rate reducing resistance to *Fusarium solani* underlies field resistance to Soybean Sudden Death Syndrome. *Crops Sci.* 37: 132 – 138.
- Nyquist, W. E. and Baker, R. J. (1991). Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10 (3): 235 - 322.
- O'Donnell, K.; Sink, S.; Scandiani, M.; Luque, A.; Colletto, A.; Biasoli, M.; Lenzi, L.; Salas, G.; González, V.; Ploper L. D.; Formento, N.; Pioli, R.; Aoki, T.; Yang, X. B.; Brice, A. J. (2010). Soybean Sudden Death Syndrome Species Diversity within North and South America Revealed by Multilocus Genotyping. *Phytopathology* 100: 58 - 71.
- Ploper, D. (1993). Síndrome de la muerte súbita: nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial Año 13 (54): 5 – 9.*

- Prabhu, R. R.; Njiti, V. N.; Bell-Johnson, B. (1999). Selecting soybean cultivars for dual resistance to soybean cyst nematode and sudden death syndrome using two DNA markers. *Crop Sci.* 39 (4): 982 – 987.
- Ribeiro Do Vale F.; Parlevliet, J. E.; Zambolim, L. (2001). Concepts in plants disease resistance. *Fitopatologia Brasileira* 26: 577- 589.
- Roy, K. W.; Rupe, J. C.; Hershman, D. E.; Abney, T. S. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis.* 81: 1100 – 1111.
- Sanitchon, J.; Vanavichit, A.; Chanprame, S.; Toojinda, T.; Triwitayakorn, K.; Njiti, V. N.; Srinives, P. (2004). Identification of Simple Sequence Repeat Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean. *Science Asia* 30: 205 – 209.
- SAS Institute Inc. (2012). *SAS/STAT® 9.3 User's Guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Scandiani, M. M.; Carmona, M. A.; Luque, A. G.; Matos, S.; Lenzi, L.; Formento, Á. N.; Martínez, C. V.; Ferri, M. R.; Lo Piccolo, M.; Tartabini, M.; Alvarez, D.; Sautua, F. (2012). Aislamiento, identificación y daños asociados al síndrome de la muerte súbita en el cultivo de soja en Argentina. *Tropical Plant Pathology* 37: 358 - 362.
- Scandiani, M. M.; Ruberti, D.; Giorda, L.; Pioli, R.; Luque, A.; Bottai, H.; Ivancovich, J. J.; Aoki, T.; O' Donnell, K. (2011). Comparison of inoculation methods for characterizing relative aggressiveness of two soybean sudden-death syndrome pathogens: *Fusarium virguliforme* and *F. tucumaniae*. *Tropical Plant Pathology* 36: 133 - 140.
- Scandiani, M.M.; Ruberti D.; O'Donnell, K.; Aoki, T.; Pioli, R.; Giorda, L.; Luque, A.; Biasoli, M. (2004). Recent outbreak of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium virguliforme* and *Fusarium tucumaniae* in Argentina. *Plant Dis.* 88: 1044.
- Semagn, K.; Bjornstad, A.; Skinnnes, H.; Maroy, A. G.; Tarkegne, T.; William, M. (2006). Distribution of DArT, AFLP and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545 - 555.

Shukla, G. (1972). Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity* 29: 237 - 245.

Snedecor, G. (1964). *Métodos Estadísticos - 5ta Edición*. México, D.F. Compañía Editorial. P.: 631.

Song, Q. J.; Marek, L. F.; Shoemaker, R. C.; Lark, K. G.; Concibido, V. C.; Delannay, X.; Specht, J. E.; Cregan, P. B. (2004). A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor Appl Genet.* 109: 122 - 128.

Stanfield, W. D. (1971). *Genética. Teoría y 400 problemas resueltos*. Serie Schaum, McGraw - Hill, México. P: 405.

SoyBase: <https://www.soybase.org/>

Tanksley, S. D. (1993). Mapping Polygenes. *Further* 27: 205 - 233.

Thompson, J. A.; Nelson, R. L.; Vodkin, L. O. (1998). Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38: 1348 – 1355.

Triwitayakorn, K.; Njiti, V. N.; Iqbal, M. J.; Yaegashi, S.; Town, C.; Lightfoot, D. A. (2005). Genomic analysis of a region encompassing QRfs1 and QRfs2: genes that underlie soybean resistance to sudden death syndrome. *Genome / National Research Council Canada* 48 (1): 125 – 38.

USDA: <https://www.usda.gov/>

Van Berloo, R. (2008). GGT 2.0: Versatile Software for Visualization and Analysis of Genetic Data, *Journal of Heredity* 99 (2): 232 - 236.

Weining, S. y Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphism in cereals base on polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82: 209 - 216.

Westphal, A.; Abney, T. S.; Xing, L. J.; Shaner, G. E. (2008). Sudden Death Syndrome of Soybean. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0102-01.

- Yamanaka, N.; Fuentes, F. H.; Gilli, J. R.; Watanabe, S.; Harada, K.; Ban, T.; Homma, Y. (2006). Identification of quantitative trait loci for resistance against soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium tucumaniae*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41 (9): 1385 – 1391.
- Yorinori, J.T. (2002). Situacao atual das doenças potenciais no cone sur (in Portuguese). In: *Proceedings, II Brazilian Soybean Congress – Mercosoja 2002, Foz do Iguazu, Brazil, June 3 – 6*. Pp.: 181 – 183.
- Young, N. D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 479 – 501.
- Zamorano, M.; Ploper, L. D.; González, V.; Gálvez, R.; Jaldo, H.; Díaz, C.; Devani, M. (2003). Evaluación de variedades comerciales de soja en su respuesta al síndrome de la muerte súbita (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) en Tucumán. *Avance Agroindustrial* Vol. 24 Nº 4: 8 - 14.
- Zhang, L. Y.; Marchand, S.; Tinker, N. A.; Belzile, F. (2009). Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. *Theoretical and applied genetics* 119 (1): 43 - 52.
- Zhu, Y. L.; Song, Q. J.; Hyten, D. L.; Van Tassell, C. P.; Matukumalli, L. K.; Grimm, D. R.; Hyatt, S. M.; Fickus, E. W.; Young, N. D.; Cregan, P. B. (2003). Single - Nucleotide Polymorphisms in Soybean. *Genetics* 163 (3): 1123 – 1134.