



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

**CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA DE LIGAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE QTLs (*QUANTITATIVE TRAIT LOCI*) PARA CARACTERES DE
IMPORTANCIA AGRONÓMICA EN ARVEJA (*PISUM SATIVUM* L.)**

Lic. MARÍA FERNANDA GUINDON

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

**DIRECTORA: Dra. VANINA CRAVERO
CO-DIRECTORA: Dra. EUGENIA MARTIN**

2017

**CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA DE LIGAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE QTLs
(*QUANTITATIVE TRAIT LOCI*) PARA CARACTERES DE IMPORTANCIA
AGRONÓMICA EN ARVEJA (*PISUM SATIVUM* L.)**

María Fernanda Guindon

Licenciada en Biotecnología – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre abril de 2012 y diciembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Vanina Cravero y la co-dirección de la Dra. Eugenia Martin.

Nombre y firma del Doctorando: Lic. María Fernanda Guindon

Nombre y firma del Director: Dra. Vanina Cravero

Nombre y firma del Co-Director: Dra. Eugenia Martin

Defendida: 29 de mayo de 2017.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron y me brindaron su apoyo durante la realización de la Tesis.

A la Dra. Eugenia Martin, por el tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo, por todos los consejos, las explicaciones y la ayuda brindada.

Al Dr. Enrique Cointry por brindarme la oportunidad de realizar mí doctorado en su grupo de investigación y a la Dra. Vanina Cravero por aceptarme para realizar este trabajo bajo su dirección. Gracias por la orientación brindada y por la atención a mis consultas.

A la gente de becarios, gracias por su compañía, consejos y apoyo.

A los integrantes de las Cátedras de Mejoramiento Vegetal y Genética por los momentos compartidos.

A mi familia y amigos, por su contención, apoyo y motivación.

PUBLICACIONES

Guindon, María Fernanda; Zayas, Aldana; Martin, Eugenia; Cravero, Vanina; Cointry, Enrique. (2013) “A preliminary linkage map in pea (*Pisum Sativum* L.) based on SRAP markers (*sequence-related amplified polymorphism*)”. (Resumen). *Biocell* 37 (3) A155.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Zayas, Aldana; Cointry, Enrique; Cravero, Vanina. (2016) “A first linkage map in *Pisum sativum* L. based on SRAP markers”. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 16: 182-188.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Guindon, María Fernanda; Zayas, Aldana; Martin, Eugenia; Cravero, Vanina; Cointry, Enrique. (2013) “Mapa preliminar de ligamiento genético en arveja basado en marcadores SRAP (*sequence-related amplified polymorphism*)”. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina.

Guindon, María Fernanda; Zayas, Aldana; Martin, Eugenia; Cointry, Enrique; Cravero, Vanina. (2014) “Aplicación de marcadores moleculares SRAP en el desarrollo de un mapa de ligamiento en arveja”. XLIII Congreso Argentino de Genética y IV Reunión Regional SAG La Pampa y Patagonia.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Cointry Enrique; Cravero Vanina. (2014) “Análisis genético de caracteres asociados a rendimiento en una población segregante de *Pisum sativum* L.” XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina.

Guindon, María Fernanda; Zayas, Aldana; Martin, Eugenia. (2015) “Desarrollo de un mapa de ligamiento en *Pisum Sativum* basado en marcadores SRAP” XXIII Jornadas Jóvenes Investigadores-AUGM. La Plata, Argentina.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Cravero Vanina; Cointry Enrique. (2015) “Linkage map development and localization of QTLs related to yield in Pea (*Pisum sativum* L.)”. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Iguazú Falls, Brazil.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Cointry Enrique; Cravero Vanina. (2015) “Estimación de parámetros genéticos en familias F_{2:3} de arveja”. XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Cravero Vanina; Cointry Enrique. (2016) “QTL detection of pod-related traits in Pea (*Pisum sativum* L.)” Second International Legume Society Conference, Tróia, Portugal.

Guindon, María Fernanda; Martin Eugenia; Cointry Enrique; Cravero Vanina. (2016) “Evaluación de parámetros genéticos relacionados a la longitud del ciclo de cultivo en arveja”. XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina.

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	- 8 -
2.	RESUMEN	- 12 -
3.	ABSTRACT	- 14 -
4.	INTRODUCCIÓN.....	- 16 -
4.1	Origen y taxonomía	- 16 -
4.2	Descripción Botánica	- 17 -
4.3	Importancia del cultivo	- 18 -
4.4	Mejoramiento genético de <i>Pisum Sativum</i>	- 19 -
4.5	Mejoramiento de caracteres cuantitativos.....	- 20 -
4.6	Mejoramiento asistido por marcadores	- 21 -
4.7	Marcadores genéticos	- 21 -
4.7.1	Marcadores Morfológicos	- 22 -
4.7.2	Marcadores Bioquímicos	- 22 -
4.7.3	Marcadores de ADN	- 23 -
4.7.4	Marcadores SRAP	- 24 -
4.7.5	Marcadores SSR	- 25 -
4.7.6	Marcadores SNP identificados por la técnica GBS	- 26 -
4.8	Análisis de ligamiento	- 28 -
4.8.1	Mapas moleculares	- 28 -
4.9	Análisis de QTLs	- 31 -
4.10	La genética en <i>Pisum sativum</i>	- 32 -
4.11	QTLs asociados a caracteres agronómicos en <i>Pisum sativum</i>	- 33 -
5.	HIPÓTESIS	- 41 -
6.	OBJETIVOS	- 41 -
6.1	Objetivo general.....	- 41 -
6.2	Objetivos específicos	- 41 -
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 42 -
7.1	Construcción de la población de mapeo	- 42 -
7.2	Evaluación fenotípica	- 43 -
7.2.1	Diseño experimental	- 43 -
7.2.2	Caracteres analizados	- 43 -
7.3	Análisis Estadísticos	- 44 -

7.3.1	Evaluación de los progenitores DDR14 y Explorer y de la generación F ₁	- 44 -
7.3.2	Evaluación de la población F ₂ y de las familias F _{2:3}	- 45 -
7.3.3	Correlaciones fenotípicas y genéticas entre variables	- 47 -
7.4	Evaluación molecular	- 47 -
7.4.1	Extracción del ADN	- 47 -
7.4.2	Marcadores SRAP	- 48 -
7.4.3	Marcadores SSR	- 49 -
7.4.4	Marcadores SNP identificados por la técnica GBS	- 51 -
7.4.5	Registro de marcadores moleculares y análisis de segregación	- 51 -
7.4.6	Construcción del mapa de ligamiento	- 52 -
7.5	Detección de QTLs	- 52 -
8.	RESULTADOS	- 54 -
8.1	Evaluación fenotípica	- 54 -
8.1.1	Evaluación de los progenitores DDR14 y Explorer y de la generación F ₁	- 54 -
8.1.2	Evaluación de la población F ₂ y de las familias F _{2:3}	- 56 -
8.1.3	Correlaciones fenotípicas y genéticas entre variables	- 64 -
8.2	Evaluación molecular	- 66 -
8.2.1	Extracción del ADN	- 66 -
8.2.2	Marcadores SRAP	- 67 -
8.2.3	Marcadores SSR	- 68 -
8.2.4	Marcadores SNP identificados por la técnica GBS	- 69 -
8.2.5	Registro de marcadores moleculares y análisis de segregación	- 70 -
8.2.6	Construcción del mapa de ligamiento	- 70 -
8.3	Detección de QTLs	- 73 -
8.3.1	Detección de QTLs con marcadores no ligados	- 78 -
9.	DISCUSIÓN	- 80 -
10.	CONCLUSIONES	- 100 -
11.	BIBLIOGRAFÍA	- 101 -
12.	ANEXOS	- 121 -

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism* (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados).

ANDEVA: Análisis de la Variancia.

AP: Altura de planta.

AV: Ancho de vaina.

BC₁: Primer generación de *backcross* (retrocruza).

BC₂: Segunda generación de *backcross* (retrocruza).

BP: Bandas polimórficas.

°C: Grado Celsius.

CAPS: *Cleaved amplified polymorphic sequence* (Secuencia polimórfica amplificada y cortada).

Cebador F: Cebador *forward* (directo).

Cebador R: Cebador *reverse* (reverso).

CF: Correlación fenotípica.

CG: Correlación genética.

CIM: *Composite interval mapping* (Mapeo de intervalo compuesto).

CM: Cuadrados Medios.

cM: Centimorgan.

cm: Centímetros.

COVF: Covarianza fenotípica.

COVG: Covarianza genética.

CTAB: *Cetyltrimethylammonium bromide* (Bromuro de cetiltrimetilamonio).

CV: Coeficiente de variación.

DF: Días a floración.

DH: Doble haploide.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

Dr.: Doctor.

DS: Diámetro de semilla.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

ER: Enzima de restricción.

EST: *Expressed sequence tag* (Marcador de secuencia expresada).

F: Prueba F de Snedecor.

F₁: Filial 1.

F₂: Filial 2.

F₃: Filial 3.

F_{2:3}: Familias F₃ provenientes de cada planta F₂.

g: Gramo.

GBS: *Genotyping by sequencing* (Genotipado por secuenciación).

GL: Grupo de ligamiento.

gl: Grados de libertad.

h²: Heredabilidad en sentido estricto.

ha: Hectáreas.

hs: Horas.

IGA: Interacción Genotipo-Ambiente.

ISSR: *Inter simple sequence repeat* (Secuencias simples internas repetidas).

LO: Longitud Oeste.

LS: Latitud Sur.

LV: Longitud de vaina.

LOD: *Logarithm of odds* (Logaritmo de las probabilidades).

m: Metro.

min: Minutos.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

mg: Miligramos.

ml: Mililitros.

mm: Milímetros.

mM: Milimolar.

NA: No alineados.

ng: Nanogramos.

NGS: *Next generation sequencing* (Secuenciaciones de nueva generación).

nm: Nanometros.

NS: Número de semillas por planta.

NV: Número de vainas por planta.

ORF: *Open Reading Frame* (Marco abierto de lectura).

p: Valor p (Estadístico de probabilidad).

P₁: Parental 1.

P₂: Parental 2.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PQL: *Protein quality loci* (Loci de cantidad de proteínas)

PS: Peso de semilla.

QTL: *Quantitative trait loci* (Loci de caracteres cuantitativos).

R²: Porcentaje de variación fenotípica.

RAPD: *Random amplified polymorphic DNA* (ADN polimórfico amplificado al azar).

rF: Coeficiente de correlación fenotípica

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

rG: Coeficiente de correlación genética.

RGA. *Resistance gene analogues* (Genes análogos de Resistencia).

RILs: *Recombinant inbred lines* (Líneas Endocriadas Recombinantes).

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

SCARS: *Sequence-characterized amplified region*. (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas).

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (Electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato de dodecil de sodio).

SF: Desviación estándar fenotípica.

SG: Desviación estándar genética.

SIM: *Simple interval mapping*. (Mapeo de intervalo simple).

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de nucleótido único).

SRAP: *Sequence related amplified polymorphism* (Polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas).

SSR: *Simple sequence repeat* (Microsatélites).

STS: *Sequence-tagged site* (Sitio de secuencia marcada).

TD: *Touchdown* (Aterrizaje).

U: Unidad de enzima.

U.N.R.: Universidad Nacional de Rosario.

UPOV: Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales.

% v/v: Porcentaje volumen en volumen definido como cantidad de mililitros que hay en 100 mililitros de solución.

% m/v: Porcentaje masa en volumen definido como la cantidad en gramos de soluto por cada 100 mililitros de solución.

VNTR: *Variable number of tandem repeats* (Número variable de repeticiones en tándem).

W: *Watt* (Vatio).

μ : Media general.

μ l: Microlitros.

μ g: Microgramos.

μ M: Micromolar.

2. RESUMEN

Las legumbres se caracterizan por poseer un alto contenido de proteínas, fibras, vitaminas y minerales y un bajo contenido en grasas. Han demostrado tener un rol sustancial en agricultura sustentable, debido a su habilidad de fijar nitrógeno reduciendo de esta manera la dependencia hacia los fertilizantes. Entre las leguminosas de grano más cultivadas en nuestro país se destaca la arveja (*Pisum sativum* L.), siendo las zonas productoras Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos. En la actualidad, los objetivos del mejoramiento de arveja están orientados hacia la obtención de materiales más precoces y al incremento del rendimiento y la calidad. El logro de nuevas variedades es un proceso largo y costoso, por lo que la incorporación de nuevas herramientas biotecnológicas que permitan delinear estrategias de mejora con una mayor eficiencia y en menor tiempo, resultan de gran utilidad. En este proyecto de tesis se planteó establecer relaciones de ligamiento genético en *Pisum sativum* L. haciendo uso de marcadores moleculares SRAP, SSR y SNP, para identificar QTLs (*Quantitative Traits Loci*) ligados a caracteres de interés agronómico. Para ello, se utilizó como población de mapeo una población F_2 y sus respectivas familias $F_{2:3}$, generadas a partir del cruzamiento entre las variedades Explorer y DDR14. Se realizó una evaluación molecular de los individuos F_2 con marcadores SRAP, SSR y SNP; y una caracterización productiva en las dos poblaciones segregantes. Se evaluó días a floración, número de vainas por planta, número de semillas por vaina, número de semillas por planta, diámetro y longitud de vaina, diámetro y peso promedio de semilla, y altura de planta en cada individuo de la población F_2 y en las familias $F_{2:3}$ durante dos ciclos productivos. Se observaron segregantes transgresivos para las variables estudiadas, lo cual demuestra la generación de nueva variabilidad genética en la población, requerida para llevar a cabo con éxito los procesos de selección. Se obtuvieron valores elevados de heredabilidad, que indican que se podría obtener una ganancia genética rápida a través de la selección para los distintos caracteres. Sin embargo, la presencia de interacción genotipo por ambiente podría limitar la correspondencia de estos valores estimados con los valores observados. La respuesta a la selección se verá limitada si el ambiente donde se realiza la misma difiere mucho del ambiente donde se evaluarán y producirán los genotipos mejorados. Por último, se evaluó el grado y la dirección de la asociación entre los caracteres a fin de determinar cómo pueden modificarse los caracteres

cuando se efectúa la selección. Se determinó una correlación alta y positiva entre los caracteres número de vaina y número de semilla y también entre longitud y ancho de vaina. Por otro lado, se observó una correlación positiva pero débil de la altura de la planta con el peso de las semillas, y una correlación débil y negativa de los días a floración con el ancho y diámetro de la vaina. La selección de genotipos superiores podría simplificarse si en lugar de realizar selección a partir de los fenotipos se identificaran directamente los genotipos mediante el uso de marcadores moleculares. Los marcadores SRAP resultaron eficientes para el estudio de la especie, generándose 261 marcadores polimórficos con segregación mendeliana, mientras que sólo diez SSR resultaron polimórficos entre los parentales utilizados. Los marcadores SNP se desarrollaron por la técnica GBS, obteniéndose 2.994 marcadores, de los cuales sólo 371 presentaron menos de 50 % de datos faltantes. Un total de 872 marcadores polimórficos se utilizaron para realizar un mapa de ligamiento. El mapa final incluyó 134 marcadores distribuidos en 9 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia total de 655,495 cM. El GL de mayor tamaño fue el GL 1, con 114,806 cM mapeados y 26 marcadores incluidos; mientras que el GL de menor tamaño fue el GL 7, con 49,117 cM mapeados y 14 marcadores. En promedio se incluyeron 14,88 marcadores por grupo de ligamiento, con una distancia promedio entre marcadores que osciló entre 3,508 para el GL 7 y 8,740 para el GL NA2. Con los datos fenotípicos y el mapa de ligamiento se realizaron los análisis de detección de QTLs a través de la técnica CIM (*composite interval mapping*). Se detectaron en total 49 QTLs en las distintas generaciones y ambientes estudiados. Los marcadores asociados a dichos QTLs podrían ser utilizados para selección asistida por marcadores, especialmente los 23 marcadores situados a distancias menores a 1 cM, si se acotan las regiones mediante la incorporación de un mayor número de marcadores moleculares. La consistencia de las asociaciones encontradas en las distintas generaciones y ambientes evaluados permitió validar tres QTLs relacionados a altura de planta, número de vaina y ancho de vaina. Los estudios desarrollados en esta tesis constituyen un primer paso para el estudio de la herencia de caracteres productivos en arveja y permiten establecer pautas para el mejoramiento de dichos caracteres en la población estudiada. La construcción de mapas de ligamiento y la detección de QTLs provee herramientas adicionales para identificar de forma temprana en los procesos de mejoramiento progenies con alelos beneficiosos, reduciendo de esta manera el tiempo de obtención de una nueva variedad.

3. ABSTRACT

“Development of a linkage map and identification of QTLs (*Quantitative Trait Loci*) for agronomic traits in pea (*Pisum sativum* L.)”

Pea is a self-pollinated, diploid ($2n=14$), annual crop produced worldwide for human consumption and animal feed. Pea breeding has been conducted with the aim of developing high yielding cultivars. The incorporation of new biotechnological tools will be useful to maximize the success probability. The aim of this project was to develop a genetic linkage map of *Pisum sativum* L. using SRAP, SSR and SNP markers and to identify QTLs (*Quantitative Traits Loci*) controlling traits of agronomic interest. An F_2 mapping population and their $F_{2:3}$ families were derived from an initial cross between cvs. Explorer and DDR14. The F_2 individuals were evaluated with SRAP, SSR and SNP markers. F_2 and $F_{2:3}$ populations were evaluated in relation to flowering days, number of pods and seeds per plant, number of seeds per pod, diameter and length of pod, diameter and weight of seeds and plant height. Transgressive phenotypes were observed in the populations, proving the generation of new variability, required to selection processes. The high values of narrow heritability obtained, indicated that rapid gain could be achieved through selection for the different traits, however, the presence of genotype environment interaction could limit the correspondence of these estimated values with the observed ones. Selection of superior genotypes can be improved through the use of genetic markers. SRAP markers proved to be efficient, generating 261 polymorphic mendelian markers. Only ten SSR were polymorphic between the parental genotypes. SNPs markers were developed through GBS, generating 2.994 markers. Only 371 markers have less than 50 % of missing data. A set of 872 polymorphic markers were used for linkage mapping. The resulting map consists of 134 genetic markers distributed in 9 linkage groups (LGs), covering a total of 655,495 cM. The length of the LGs ranged from 49,117 to 114,806 cM, with 14 to 26 markers. QTL detection was performed using the composite interval mapping (CIM) method. A total of 49 QTLs were detected through the generations and environments evaluated. The comparison among QTLs detected in the F_2 population and $F_{2:3}$ families in the two environments allowed assessing the consistency of three QTLs for plant height, pods number and width. Linkage mapping and QTL

detection provide additional tools to identify progeny containing desirable alleles early in the breeding process to reduce the time of cultivar release.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Origen y taxonomía

La arveja (*Pisum sativum* L.) es uno de los cultivos domesticados más antiguos del mundo (aproximadamente 10.000 años atrás). Si bien su centro de origen se encuentra en el Mediterráneo, principalmente en el Medio Oriente; a causa de haber sido domesticado muy tempranamente, es difícil identificar su localización precisa (Maxted y Ambrose, 2001). Antes de ser cultivada, la arveja, junto con el garbanzo (*Cicer Arietinum* L.), era parte de la dieta cotidiana de los cazadores-recolectores en el final de la última Edad de Hielo en el Medio Oriente y Europa, trayendo estabilidad a las tribus que eran nómades y facilitando su establecimiento permanente. Desde allí fueron necesarios al menos, siete eventos de dispersión hacia América, para explicar los patrones de distribución actual de todas las legumbres, incluida la arveja. En Sudamérica la dispersión puede haber ocurrido dos veces desde el Mediterráneo y una vía Norte América (Schaefer *et al.*, 2012). Posteriormente, por siglos de selección y mejora, miles de variedades de arveja fueron desarrolladas y, actualmente, se conservan en numerosas colecciones de germoplasma en todo el mundo (Smýkal *et al.*, 2011, Smýkal *et al.*, 2012, Smýkal *et al.*, 2015).

El género *Pisum* pertenece a la familia *Leguminosae*, que constituye la tercer familia más grande de plantas con flores, con más de 750 géneros y 20.000 especies distribuidas por todo el mundo (Upadhyaya *et al.*, 2011). La clasificación dentro del género *Pisum* ha cambiado con el tiempo; inicialmente se reconocían cinco especies (Govorov, 1937), mientras que actualmente se reconocen dos: *P. sativum* y *P. fulvum* (Smýkal *et al.*, 2015; Warkentin *et al.*, 2015). Algunos autores (Jing *et al.*, 2010) consideran a *P. abyssinicum* como una tercera especie, debido a que presenta características fenotípicas propias (floración temprana y folíolos fuertemente aserrados), pero los estudios basados en la secuencia de ADN lo clasifican como una subespecie de *P. sativum* (Smýkal *et al.*, 2012).

En base a estudios morfológicos y genéticos, *P. fulvum* fue identificado como germoplasma silvestre, debido a que las plantas poseen vainas dehiscentes y latencia de semillas, características necesarias para la supervivencia natural, pero no deseadas en un cultivo domesticado. En cambio

dentro de *P. sativum* se encontraron variedades domesticadas y silvestres (Warkentin *et al.*, 2015).

4.2 Descripción Botánica

La arveja (*Pisum sativum* L.) (Figura 1), es una especie diploide ($2n = 14$ cromosomas), autógena, anual y herbácea.

El tamaño de la planta varía de 25 a 250 cm, las distintas variedades pueden ser de porte enano (25-70 cm de altura); de media rama (70-100 cm) y de enrame (más de 100 cm) (Brandan y Ploper, 1999).

La raíz es pivotante con numerosas raíces laterales y presenta nódulos que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Los tallos son trepadores, angulosos y ligeramente estriados. Sus hojas son compuestas y paripinadas, y constan de tres estructuras básicas: las estípulas, los folíolos y los zarcillos. Las estípulas, de tamaño mayor que los folíolos, se insertan en la base del pecíolo de la hoja (Brandan y Ploper, 1999). Existen especies, que se denominan semiáfili, en las que los folíolos están transformados en zarcillos (Goldenberg, 1965), por tanto, poseen una disminución del área foliar. Asimismo, existen especies áfili que además de poseer folíolos transformados en zarcillos poseen estípulas muy pequeñas.

Las flores son pentámeras blancas, moradas, salmón, naranja o verdes, con nacimiento individual o en racimos de una o dos flores en las axilas de las hojas. El cáliz gamosépalo presenta cinco sépalos de color verde pálido, los cuales son muy persistentes. La corola está formada por cinco pétalos irregulares llamados alas, estandarte y quilla y presenta coloración blanca, morada, salmón, naranja o verde (Alfonso, 2001).

Los frutos son vainas alargadas y oblongas de diferentes tonos de verde o moradas. Las vainas son algo comprimidas y terminan en una pequeña curva. Su tamaño es muy variable (entre 3 y 15 cm) y pueden contener entre dos a once granos (Brandan y Ploper, 1999). El número de granos se considera bajo cuando varía entre dos y cuatro, medio cuando oscila entre cinco y seis, y alto cuando es superior a siete (Gent, 1988). Estos granos pueden ser lisos o rugosos y con color de cotiledón, verde, amarillo o naranja. Por otra parte, la disposición de las semillas dentro de la vaina puede ser: espaciada (las semillas adyacentes prácticamente no se tocan), medio compacta (las semillas se tocan, pero no se comprimen), comprimidas (las semillas se tocan una a otra y se

comprimen), y muy comprimidas (entre tres y seis semillas pegadas). El peso de 100 semillas varía entre 14 g y más de 30 g (Brandan y Ploper, 1999).

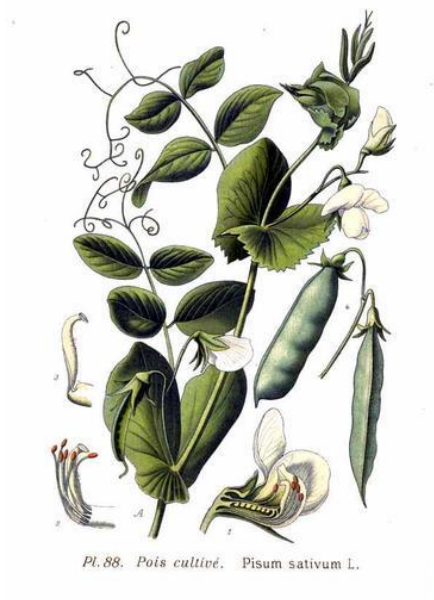


Figura 1. Imagen de planta de arveja. Extraído de *Legumes of the world* (Lewis, 2005).

4.3 Importancia del cultivo

Económicamente, las legumbres representan la segunda familia más importante dentro de las plantas de cultivo después de las *Poaceae* (gramíneas), contabilizando aproximadamente el 27 % de la producción mundial (Graham y Vance, 2003). A su vez, la arveja seca ocupa el segundo puesto como la legumbre de grano más cultivada en el mundo, con una producción global de 11.332 millones de toneladas en 2014 (FAO, 2014). La demanda de arvejas es alta y sostenida dado el gran consumo en países de Asia como India, China y Bangladesh, que son los principales compradores del mundo. El mayor exportador a nivel global es Canadá y le siguen por volumen Rusia y EE.UU y en un rango inferior Francia y Australia. En Sudamérica el principal productor y exportador de arvejas es Argentina (Janzen *et al.*, 2014).

En nuestro país el área sembrada alcanzó una superficie de 45.435 hectáreas durante el 2015 y la producción fue de 113.033 toneladas. Cabe señalar, que las siembras en un principio se localizaron en la zona núcleo de la región pampeana, conformada por el sudeste de Santa Fe y el norte de Buenos Aires, pero en los últimos años se extendió la propuesta productiva a la zona

oeste y centro de Buenos Aires y Santa Fe, sur de Córdoba y oeste de Entre Ríos (De Bernardi, 2016).

Uno de los atributos más importantes de las legumbres, es su capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno, constituyendo una importante fuente de este elemento en los ecosistemas naturales y agrícolas (Nemecek *et al.*, 2008). También acumulan productos naturales (metabolitos secundarios) tales como isoflavonoides, que son considerados beneficiosos para la salud humana debido a sus propiedades anti-cancerígenas y antioxidantes entre otras (Dixon y Sumner, 2003).

Las semillas de arveja son ricas en proteína (23-25 %), almidón de digestión lenta (50 %), azúcares solubles (5 %), fibra, minerales y vitaminas (Dahl *et al.*, 2012). En todo el mundo, las legumbres contribuyen con cerca de un tercio del consumo directo de proteínas por la humanidad, siendo también una importante fuente de forraje, combustible y aceites industriales. Las arvejas y sus productos derivados son utilizadas en una gran variedad de preparaciones debido a su valor nutritivo, su bajo costo, su versatilidad para ser cocinadas y las propiedades funcionales de sus componentes. De esta manera, pueden comercializarse arvejas secas y congeladas, arvejas enlatadas, harina de arveja, snacks, sopas, concentrados y aislados proteicos, almidón nativo y modificado (Maskus, 2010; Annor *et al.*, 2014).

4.4 Mejoramiento genético de *Pisum Sativum*

El mejoramiento genético de las especies contribuye a la seguridad alimentaria mundial al permitir el desarrollo de nuevas variedades de alto rendimiento, adaptadas a distintas condiciones ambientales, resistentes a pestes, enfermedades o sequía. En el caso de la arveja los principales objetivos del mejoramiento consisten en incrementar la cantidad de semilla producida por unidad de superficie y mejorar la calidad de la misma. Sin embargo, estos objetivos pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales y del destino de la semilla (consumo fresco, consumo seco, industria) (Brandan y Ploper, 1999).

La reducción de la diversidad genética dentro de las legumbres debido a la domesticación y a las estrategias modernas de mejoramiento y selección implica un incremento de la vulnerabilidad frente a factores bióticos y abióticos y una limitación de la capacidad de responder a nuevas necesidades. Esta situación genera en los mejoradores la necesidad de explorar el germoplasma de la especie buscando caracteres de interés, como productividad, precocidad, calidad, etc. (Amin

et al., 2010; Duc *et al.*, 2014). Actualmente, en los bancos de germoplasma nacionales de, al menos, 15 países existen colecciones importantes de *Pisum* con más de 2.000 accesiones, junto con muchas otras colecciones más pequeñas en todo el mundo (Smýkal *et al.*, 2012).

Para generar nuevas variedades que enfrenten el desafío de las adversidades bióticas y abióticas es importante realizar cruzamientos entre las distintas accesiones seguido por un proceso de selección que resulte en cultivares con las características agronómicas deseadas. Mediante los cruzamientos se combinan las mejores características de las variedades parentales, al tiempo que se aumenta la variabilidad. Mediante la selección se van fijando los caracteres de interés, ya que la frecuencia de los alelos favorables en una población aumenta con cada ciclo de selección.

A pesar del éxito obtenido por los programas de mejora convencional, esta aproximación tiene una limitación fundamental: se necesitan muchas generaciones de selección para fijar las características de interés, y esto supone una gran inversión de tiempo, espacio y recursos.

4.5 Mejoramiento de caracteres cuantitativos

La selección de genotipos deseables resulta aún más compleja cuando se trabaja con caracteres cuantitativos. La complejidad fenotípica de estos rasgos, que exhiben variación continua, surge de la segregación e interacción de diferentes alelos en múltiples *loci*, cuya expresión depende de factores ambientales. Las regiones del genoma asociadas a estos caracteres se denominan QTLs (Loci de caracteres cuantitativos, del inglés *Quantitative Trait Loci*).

Este tipo de caracteres se describen en términos de parámetros estadísticos, principalmente a través de su valor medio y su variación en una población. Para determinar el esquema de mejora más apropiado para estos caracteres es importante conocer la contribución relativa del componente genético a la variación total del mismo. El parámetro que se utiliza para medir la proporción de la varianza fenotípica de un carácter cuantitativo debida exclusivamente a los efectos aditivos de los genes es la heredabilidad en sentido estricto (Kearsey y Pooni, 1996). La heredabilidad no es una propiedad intrínseca de un carácter, sino que depende de la población y de las condiciones ambientales a las que están sujetos los individuos.

Por otro lado, identificar los individuos o cultivares que reúnan simultáneamente las características deseables no es fácil, dado que muchos se encuentran asociados positiva o negativamente. La herramienta estadística que permite estimar el grado y naturaleza de tales

asociaciones es el coeficiente de correlación (r). Esta asociación puede tener una base genética o no. Si existe correlación genética entre dos caracteres la selección hacia uno de ellos causará cambios en el otro. La magnitud de este tipo de correlación puede deberse a pleiotropía (un solo gen afecta simultáneamente a diferentes vías metabólicas) ó ser el reflejo de un ligamiento genético. Las correlaciones pueden ser utilizadas para realizar selección indirecta para una característica a través de otra más fácil de medir o de mayor heredabilidad; para estimar el cambio que se produce cuando se realiza selección en una característica sobre las otras asociadas y para desarrollar índices de selección simultánea para varios caracteres (Falconer, 1960).

Los caracteres cuantitativos importantes en el cultivo de arveja incluyen rendimiento y calidad de semilla, resistencia al frío y a patógenos. Muchos estudios genéticos han puesto de manifiesto que la mejora de estos caracteres requiere de marcadores de ADN que mejoran la eficacia y la precisión de los métodos convencionales de mejora.

4.6 Mejoramiento asistido por marcadores

Los mejoradores deben responder constantemente a distintos cambios. Primero, los cambios en las prácticas agrícolas, que crean la necesidad de desarrollo de genotipos con características específicas. Segundo, los cambios en los ambientes y los organismos que habitan en él. Por último, aunque no menos importante, los cambios en las preferencias y requerimientos de los consumidores. Además, los programas de mejoramiento deben aumentar el rendimiento de los cultivos dado que el crecimiento global de la población requiere de un incremento en la producción agrícola de alimentos (Tester y Langridge, 2010). A pesar de los logros alcanzados a partir del mejoramiento convencional, la utilización de nuevas tecnologías es necesaria para acelerar los procesos, mejorando los métodos de fenotipado y genotipado y aumentando la diversidad genética disponible. La selección asistida por marcadores es una herramienta muy interesante, ya que permite acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas.

4.7 Marcadores genéticos

Un marcador genético es una diferencia (polimorfismo) heredable de forma mendeliana simple, cuya variabilidad puede ser detectada y estudiada. Son de gran utilidad en análisis de diversidad

genética, estudios sistemáticos y evolutivos, identificación de genotipos, etc. Un marcador genético ideal es aquél que presenta un elevado polimorfismo, una herencia de tipo mendeliana, no se ve afectado por el ambiente, es codominante (capaz de discriminar individuos homocigotas de heterocigotas), de rápida identificación, de simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de un individuo.

Existen tres categorías principales de marcadores genéticos: 1) morfológicos (también llamados clásicos o visibles) los cuales son en sí mismos características fenotípicas; 2) bioquímicos, los cuales incluyen a las isoenzimas y proteínas de reserva; y 3) marcadores de ADN (o moleculares), que son sitios de variación del ADN (Winter y Kahl, 1995; Jones *et al.*, 1997).

4.7.1 Marcadores Morfológicos

Los marcadores morfológicos son características fenotípicas de fácil identificación visual, tales como forma, tamaño, color o altura de una planta. La caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. Es una metodología de bajo costo y sencilla; la cual ha sido ampliamente utilizada en el cultivo de arveja (Tar'an *et al.*, 2005; Espósito *et al.*, 2007; Smýkal *et al.*, 2008; Dumont *et al.*, 2009; Espósito *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2009; Sarikamiş *et al.*, 2010; Gatti *et al.*, 2011). Sin embargo, presentan limitaciones, debido a que algunas características no son evidentes durante las fases tempranas del desarrollo, el número de caracteres registrables es reducido, se observa un nivel bajo de polimorfismos, una frecuencia considerable de dominancia alélica y, en muchos casos, un control poligénico con marcada influencia ambiental.

4.7.2 Marcadores Bioquímicos

Los principales marcadores bioquímicos son los enzimáticos, basados en el hecho de que dos variantes de una misma enzima (isoenzimas) pueden presentar diferencias de carga y por lo tanto pueden ser separadas por electroforesis en geles de almidón. La mayor ventaja de las técnicas electroforéticas sobre los marcadores morfológicos radica en su codominancia y la menor influencia que el ambiente ejerce sobre los mismos. El contenido de proteínas de reserva del endosperma también puede ser empleado como marcador bioquímico, y se evalúa a través de la técnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Estos

marcadores han sido utilizados en arveja en distintos tipos de estudio (Baranger *et al.*, 2004; Smýkal *et al.*, 2008; Dumont *et al.*, 2009; McPhee *et al.*, 2012; Haider *et al.*, 2013).

Las principales desventajas de los marcadores bioquímicos, al igual que los morfológicos, están determinadas por su cantidad limitada y por la influencia tanto por parte del ambiente como de la fase de desarrollo de la planta (Winter y Kahl, 1995).

4.7.3 Marcadores de ADN

El continuo avance de la biología molecular permitió la generación de distintos marcadores moleculares, mediante los cuales se logró sobrepasar las limitaciones observadas con el uso de marcadores morfológicos y bioquímicos. Un marcador molecular se basa en la presencia de variaciones de la secuencia del ADN. Presentan numerosas ventajas, tales como 1) no están influenciados por el ambiente, 2) presentan un alto nivel de polimorfismo y no tienen efectos pleiotrópicos ni epistáticos, 3) muestran, en algunos casos, una expresión de tipo codominante, 4) comprenden cualquier parte del genoma, sea codificante o no codificante (intrones o regiones regulatorias), 5) pueden ser utilizados en estadios tempranos del desarrollo y 6) la mayor parte de los polimorfismos moleculares son neutros, por lo tanto una variación alélica en un locus marcador generalmente no tiene efectos a nivel fenotípico (Collard *et al.*, 2005).

Los primeros marcadores moleculares fueron desarrollados a fines de los años '70 y estuvieron basados en la hibridación de sondas oligonucleotídicas: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein *et al.*, 1980) y VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Jeffreys *et al.*, 1985).

El desarrollo de la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1988) permitió la generación de nuevos marcadores a finales de los '80 y principios de los '90: los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) y los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Litt y Luty, 1989). La detección de los primeros se basa en la amplificación al azar de polimorfismos de ADN a partir de cebadores cortos de secuencia aleatoria. Los microsatélites, por otro lado, se basan en la amplificación de loci específicos a partir de cebadores complementarios a las secuencias que flanquean el segmento de interés. El número de marcadores basados en la PCR siguió aumentando con la aparición de los AFLP

(*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995) y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Wang, 1998) entre otros.

4.7.4 Marcadores SRAP

La técnica SRAP (*sequence-related amplified polymorphism*) (Li y Quiros, 2001) ha sido reconocida como un sistema de marcadores moleculares de suma utilidad tanto para caracterización como para mapeo genético, siendo factible su aplicación en la selección asistida. Es una técnica simple desarrollada para especies del género *Brassica* (Li y Quiros, 2001) y utilizada posteriormente para estudios de diversidad genética en alcaucil (Cravero *et al.*, 2007), arveja (Espósito *et al.*, 2007), lenteja (Bermejo *et al.*, 2010) y sorgo (Lekgari y Dweikat, 2014), para detección de marcadores asociados a un carácter de interés en alcaucil (Martin *et al.*, 2008) y pepino (Zhang *et al.*, 2010), y para construcción de mapas de ligamiento en algodón (Lin *et al.*, 2003), melón (Wang *et al.*, 2008) y alcaucil (Martin *et al.*, 2013).

Estos marcadores pueden combinarse con técnicas de secuenciación para aumentar su capacidad y efectividad. Li *et al.* (2011) utilizaron la plataforma de secuenciación Illumina/Solexa para integrar nuevos marcadores SRAP en el mapa de ligamiento de *Brassica rapa*.

La técnica está orientada a la amplificación de ORF (*Open Reading Frame*) y se basa en la amplificación de regiones codificantes del genoma a partir de dos cebadores (*primers*). Los cebadores tienen una longitud de 17 o 18 nucleótidos, con una secuencia principal de 13 a 14 nucleótidos de longitud, de los cuales las 10 primeras bases del extremo 5' terminal son una secuencia de constitución no específica (secuencia de relleno), seguida de la secuencia CCGG en el cebador F (del inglés *forward*, directo) y AATT en el cebador R (del inglés *reverse*, inverso). La secuencia central es seguida por tres nucleótidos selectivos en el 3' terminal. La secuencia de relleno de los cebadores F y R son diferentes para cada uno de ellos (Li y Quiros, 2001). Dado que las regiones exónicas están normalmente muy conservadas entre individuos, lo que resultaría en bajos niveles de polimorfismo, se incluye en el cebador R la secuencia AATT cerca de la región 3' a fin de que reconozca regiones ricas en AT, las cuales normalmente se encuentran en promotores e intrones (Figura 2).

El polimorfismo observado es el resultado de dos eventos 1) cambios en la longitud de los fragmentos debido a inserciones y deleciones, que generan marcadores codominantes en casos de

pequeños cambios y dominantes cuando los cambios son muy grandes e impiden la amplificación, y 2) sustituciones de nucleótidos que impiden la unión de los cebadores al ADN molde, lo cual genera marcadores de tipo dominante (Li y Quiros, 2001).

La utilidad de los marcadores SRAP para realizar mapas de ligamiento en arveja ha sido probada recientemente por nuestro grupo de trabajo (Guindon *et al.*, 2016).

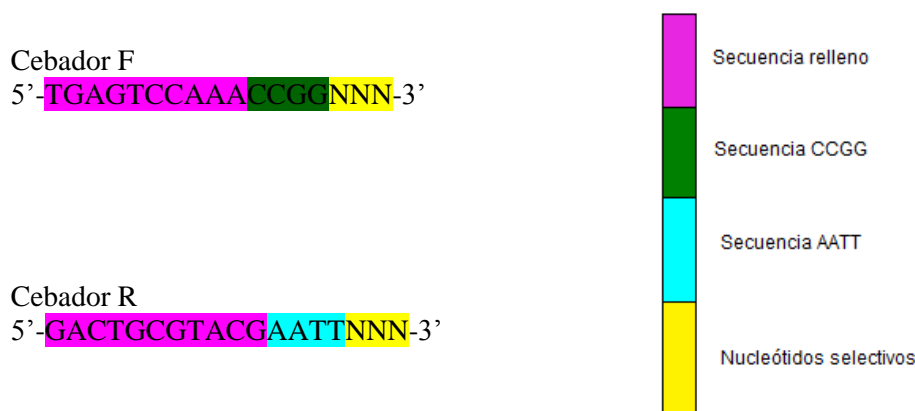


Figura 2. Diseño cebadores SRAP.

4.7.5 Marcadores SSR

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN, con un patrón específico de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem hasta 60 veces que se hallan en el genoma del núcleo y las organelas. Se encuentran distribuidos densa y homogéneamente por todo el genoma, tanto en regiones codificantes como no codificantes, si bien son menos abundantes en los exones (Kalia *et al.*, 2011). Durante la replicación del ADN puede ocurrir un deslizamiento de la ADN polimerasa en la región repetida de la hebra molde que va a originar una expansión o contracción de la región en la nueva hebra replicada, si el error no es corregido. Debido a su excepcional variabilidad, codominancia y su relativa facilidad de análisis, las secuencias microsatélites son consideradas como uno de los marcadores moleculares más poderosos, pero su desarrollo ha sido una de las limitantes para su utilización. Una gran cantidad de marcadores microsatélites específicos de arveja han sido desarrollados y se encuentran disponibles para realizar estudios en la especie (Burstin *et al.*, 2001; Loridon *et al.*, 2005; Tar'an *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015).

4.7.6 Marcadores SNP identificados por la técnica GBS

Los marcadores SNP se refieren a polimorfismos de ADN a nivel de pares de bases individuales y constituyen el 90 % de la variación en cualquier organismo. Son abundantes y están distribuidos uniformemente a lo largo de todo el genoma de un individuo (Gupta *et al.*, 2008).

Los avances de la tecnología, en conjunto con la necesidad de reducir el costo y simplificar la identificación de los SNPs, han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva denominadas NGS (*Next generation sequencing*). Dentro de las nuevas estrategias para identificación de SNPs, se encuentra la metodología GBS (*Genotyping by sequencing*). Esta técnica implica la creación de bibliotecas de genoma reducido de ADN, que luego son secuenciadas para realizar los análisis bioinformáticos correspondientes. Para reducir la complejidad del genoma se utilizan enzima de restricción (ER) sensibles a metilación en su digestión. Esta técnica requiere de dos tipos de adaptadores, los primeros corresponden a oligonucleótidos que son complementarios a la secuencia que se encuentra unida a la celda de flujo del secuenciador y los segundos son códigos de barra, que permiten la identificación de las muestras. Debido a que cada individuo presenta un código de barra diferente, es posible secuenciar una gran cantidad de muestras de forma simultánea en una reacción (Baird *et al.*, 2008; Elshire *et al.*, 2011). Los fragmentos con los adaptadores son amplificados mediante PCR y secuenciados. En la Figura 3 se observa un diagrama de la técnica GBS (Myles, 2013). Una vez obtenidos los datos de la secuenciación es necesario realizar análisis bioinformáticos para identificar los marcadores SNP. El análisis consta de dos etapas, la primera comprende el procesamiento de secuencias y el alineamiento de las mismas (contra un genoma de referencia o contra ellas mismas) y la segunda implica la identificación de los SNPs y el genotipado de las muestras. En las especies que no cuentan con un genoma de referencia descrito, se construye una referencia, esto es un ensamble de novo, en el cual las secuencias individuales se agrupan y fusionan para formar fragmentos contiguos denominados “*contigs*”, que comparten la misma secuencia de nucleótidos. Posteriormente los *contigs* son ensamblados para crear secuencias de mayor tamaño, denominadas “*scaffolds*”. Existen diversas herramientas disponibles para la realización de estos análisis, algunos de los paquetes informáticos son: Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012) y Samtools (Li *et al.*, 2009). Este procedimiento ha resultado adecuado para estudios de caracterización de germoplasma (Lu *et al.*,

2013; Fu *et al.*, 2014; Chew *et al.*, 2016; Gürcan *et al.*, 2016), selección genómica (Romay *et al.*, 2013; Taranto *et al.*, 2016), mejoramiento y mapeo de diversos organismos (Baird *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015b; Celik *et al.*, 2016). Las principales ventajas de este sistema incluyen su bajo costo, el bajo procesamiento de las muestras, debido a que hay pocos pasos de PCR y purificación, y, además, no es necesario contar con un genoma de referencia (Davey *et al.*, 2011). Existen algunos inconvenientes asociados a la técnica, como la cantidad de datos faltantes que se producen si se lo compara con otros tipos de marcadores moleculares y la tasa de error asociada con el método (Furuta *et al.* 2017). Sin embargo, GBS se está convirtiendo en una herramienta muy importante para el mejoramiento asistido por marcadores en un rango amplio de especies vegetales (He *et al.*, 2014).

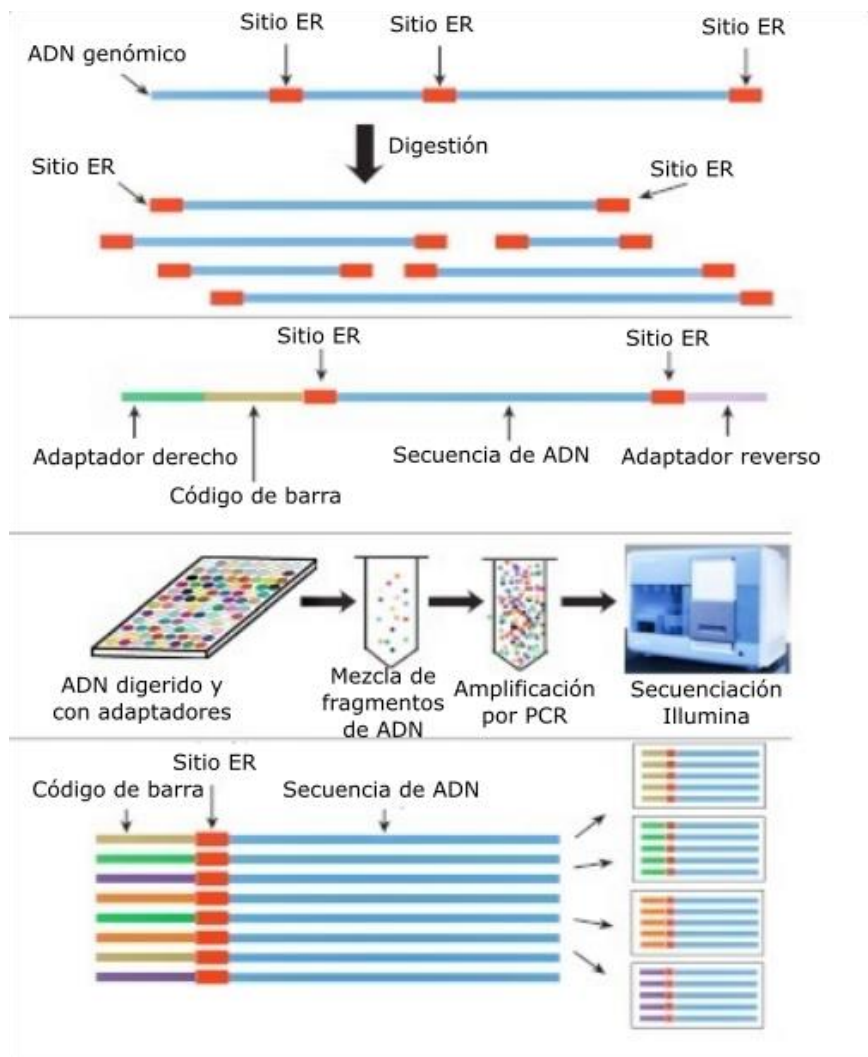


Figura 3. Esquema de la técnica GBS. Adaptado de Myles (2013). ER: Enzima de restricción.

4.8 Análisis de ligamiento

4.8.1 Mapas moleculares

Un mapa genético o de ligamiento es un modelo del orden de los genes o marcadores dentro de un cromosoma o grupo de ligamiento. Estos modelos permiten comprender la forma en que está organizado el genoma de una especie y constituyen una herramienta útil en el mejoramiento genético vegetal permitiendo la identificación de marcadores ligados a genes de importancia y facilitando la caracterización de QTLs asociados a caracteres de interés.

Los análisis de ligamiento se basan en los eventos de entrecruzamiento, que tienen lugar durante la meiosis, y que generan intercambios de segmentos entre los cromosomas homólogos. La

posibilidad de que ocurra el entrecruzamiento está directamente relacionada con la distancia entre dos genes; cuanto menor sea la frecuencia de recombinación entre dos marcadores, más cerca se sitúan en el cromosoma.

De acuerdo a Collard *et al.* (2005), hay tres puntos fundamentales en la construcción de los mapas de ligamientos: 1) producción de una población de mapeo, 2) identificación de polimorfismos, 3) análisis de ligamiento de los marcadores.

1) Poblaciones de mapeo (Figura 4): En general, la población segregante más ampliamente utilizada para la construcción de mapas de ligamiento en especies vegetales son las poblaciones F_2 , las cuales son obtenidas por la autofecundación del material híbrido F_1 previamente generado por el cruzamiento de dos líneas parentales homocigotas. En la estrategia BC_1 (primera generación de retrocruza), los híbridos F_1 son retrocruzados con una de las líneas parentales. Mientras que el BC_1 permite el análisis de segregación proveniente sólo de uno de los parentales, la estrategia F_2 tiene la ventaja de permitir obtener el doble de información dado que es analizada la segregación de ambos parentales. Ambas estrategias son factibles de ser utilizadas en el caso de evaluar especies en las que puede disponerse de líneas parentales homocigotas. En el caso de plantas anuales, las poblaciones F_2 y BC_1 no pueden ser mantenidas en el tiempo. En este contexto, surge el interés por el análisis de familias $F_{2:3}$ las cuales han demostrado ser de gran utilidad para el mapeo de QTLs (Ferreira *et al.*, 2006). Este diseño incorpora la información de la progenie F_3 derivada de cada planta F_2 . Se ha demostrado que este tipo de familias brindan una gran cantidad de información genética y que la variación observada en diferentes caracteres está en gran parte controlada genéticamente. Si el tamaño de la familia $F_{2:3}$ es lo suficientemente grande, el valor promedio de la familia representará el valor genotípico de la planta F_2 . (Zhang y Xu, 2004; Ding *et al.*, 2011).

A partir de individuos de una F_2 , mediante sucesivos ciclos de autofecundación, se construyen líneas puras recombinantes (RIL, *recombinant inbred line*), las cuales consisten en una serie de líneas homocigotas con una única combinación de segmentos cromosómicos de los padres originales. La mayor desventaja de este tipo de poblaciones es el tiempo requerido para su obtención, generalmente son necesarias entre seis y ocho generaciones. Las poblaciones de haploides duplicados (DH) pueden ser producidas mediante la inducción de la haploidía, a partir del cultivo de anteras o microsporas, o de hibridaciones interespecíficas e intergenéricas, y la

posterior duplicación cromosómica. Esta estrategia es aplicable sólo en especies donde hay protocolos establecidos para la inducción de organismos haploides. La mayor ventaja de las poblaciones RIL y DH es que producen líneas homocigotas que pueden ser multiplicadas y reproducidas sin que ocurran cambios genéticos. Esto permite la realización de ensayos en distintas localizaciones y años.

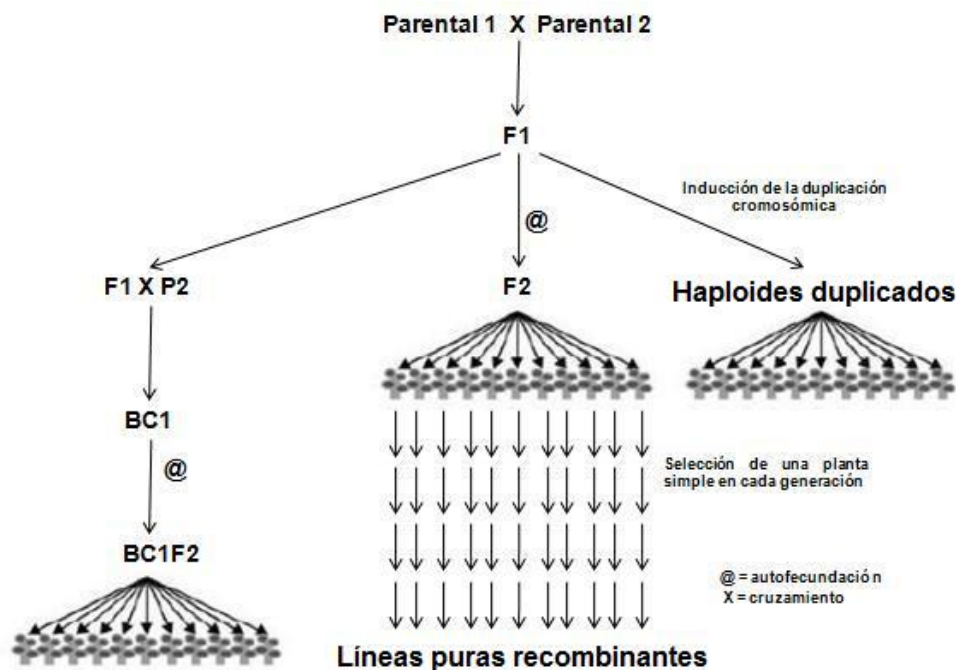


Figura 4. Diagrama de los principales tipos de poblaciones de mapeo (Collard et al., 2005).

2) Identificación de polimorfismos: Es crítico que exista suficiente polimorfismo entre los parentales para la construcción de un mapa de ligamiento. Una vez identificados los marcadores polimórficos, que muestran diferentes alelos en los parentales, se procede al genotipado de los individuos de la población. Para comprobar si los marcadores segregan según las proporciones esperadas se suelen realizar pruebas chi-cuadrado. Generalmente los marcadores segregan de forma mendeliana, aunque suelen encontrarse marcadores con segregación distorsionada. Esta distorsión puede deberse a diversos factores, como el tipo y el tamaño de la población de mapeo, la asociación con genes que determinan viabilidad o funcionalidad gamética o esporofítica, o errores en la toma de datos (Zhao et al., 2006).

3) Análisis de ligamiento de los marcadores: El ligamiento entre marcadores es usualmente calculado como la probabilidad de que dos marcadores estén ligados, versus la probabilidad de que no lo estén. Estas probabilidades son expresadas como LOD score (*Logarithm of odds*). Un LOD score de tres entre dos marcadores indica que la hipótesis de ligamiento es 1.000 veces más probable que la hipótesis de no ligamiento. Para ordenar los marcadores ligados se han descrito diferentes algoritmos que calculan la bondad de un mapa determinado entre todos los posibles. El programa JoinMap calcula de forma automática las ordenaciones que hacen mínimos los cuadrados de la diferencia entre los valores de recombinación observados (obtenidos directamente de todos los pares de valores) y los estimados en el mapa (Stam, 1993). De este modo, a partir de los dos marcadores más próximos en el grupo a ordenar, se van añadiendo nuevos loci y al final se obtiene la bondad del mapa medida con un valor chi-cuadrado (Van Ooijen, 2006). La distancia a lo largo del mapa de ligamiento es medida en términos de la frecuencia de recombinación entre los marcadores. Comúnmente se utilizan dos funciones de mapeo que convierten estas frecuencias de recombinación en centiMorgans (cM); la función Kosambi, que asume que los eventos de recombinación influyen en la ocurrencia de eventos de recombinación adyacentes, y la función Haldane que asume que no hay interferencia entre los eventos de entrecruzamiento (Collard *et al.*, 2005).

4.9 Análisis de QTLs

El mejoramiento genético de una especie implica el conocimiento de la genética de los caracteres de interés. Muchos de estos caracteres son controlados por varios genes y son conocidos como caracteres cuantitativos. El primer requisito para el mapeo genético de un locus que controla un carácter cuantitativo o QTL, es la existencia de una asociación estadística significativa entre la segregación del carácter y la segregación de un marcador genético en una población determinada (Jensen, 1989). Diversos métodos estadísticos han sido propuestos para el análisis de QTLs.

El mapeo mediante pruebas simples de marcador es uno de los métodos más sencillos en el análisis de QTL, consiste en analizar la segregación de un fenotipo con respecto a los marcadores genotipados para evaluar que marcadores están asociados con el carácter de interés, sugiriendo de este modo la existencia de un posible QTL. En este enfoque se pueden utilizar tres técnicas estadísticas: prueba T, análisis de varianza (ANDEVA) y regresión linear simple. La hipótesis

nula que se somete a prueba es que el valor de la media del carácter es independiente del genotipo para un marcador dado (Doerge, 2002). Estas técnicas tienen tres debilidades principales: la primera es la falta de precisión al estimar la localización y los efectos del QTL, dado que éstos son indicados indirectamente a través de los valores del marcador; la segunda es que se deben descartar individuos para los que no se tiene información para el marcador; y la tercera es que, cuando los marcadores están muy espaciados, el QTL podría estar muy alejado de los mismos, disminuyendo el poder de detección (Broman, 2001).

El mapeo de QTL por intervalos simples (SIM, por sus siglas en inglés *Simple Interval Mapping*) supera las desventajas del método anterior. El método fue desarrollado por Lander y Botstein (1989) y utiliza un mapa genético definiendo intervalos a través de los marcadores sobre los cuales se efectúa la localización de los QTLs. Mediante técnicas estadísticas de máxima verosimilitud se estima si un QTL está presente o no en una localización dentro de un intervalo dado. Además se pueden estimar los efectos aditivos y los efectos de dominancia de los QTLs detectados. El resultado de cada prueba estadística es expresado en puntuación LOD, que indica el nivel de evidencia de la presencia de un QTL en esa posición. Cuando el pico de la puntuación LOD máximo excede el umbral establecido se rechaza la hipótesis nula de que ningún QTL se encuentra dentro de esa posición para el intervalo testado. Una de las mayores desventajas del mapeo por intervalos es que el modelo del análisis solo considera un QTL a la vez, por lo tanto puede haber un sesgo en la estimación de la localización del QTL cuando múltiples QTLs están presentes (Lander y Botstein, 1989; Haley y Knott, 1992; Zeng, 1994).

El problema de QTLs múltiples fue resuelto de manera independiente por Jansen (1993) y Zeng (1994) que diseñaron el mapeo por intervalos compuesto (CIM, por sus siglas en inglés *Composite Interval Mapping*). Este método utiliza un conjunto de marcadores ligados a los posibles QTLs como covariables (cofactores), de modo que se incrementa la resolución del mapeo al eliminar la variabilidad asociada a otros QTLs.

4.10 La genética en *Pisum sativum*

La genética de la arveja ha sido objeto de estudio por largo tiempo (Knight, 1799; Mendel, 1865), pero, llamativamente, los avances en cuanto a la estructura del genoma y la organización de los grupos de ligamiento es muy limitado (Ellis y Poyser, 2002).

El cariotipo de la arveja comprende siete cromosomas: cinco acrocéntricos (cromosomas 3, 4, 5, 6, 7) y dos cromosomas submetacéntricos (cromosomas 1 y 2). El genoma nuclear comprende cerca de 4×10^9 pares de bases, aunque las estimaciones varían en un 20 %. Presenta un contenido de GC del 37,7 %, pero en común con muchos eucariotas, este contenido de GC varía y parece estar distribuido en regiones relativamente largas de composición de bases similar (Smýkal *et al.*, 2012). El genoma de la arveja se compone de un alto número de copias de secuencias repetidas dispersas (Ellis y Poyser, 2002). La complejidad de este genoma ha detenido el progreso en el desarrollo de recursos genómicos para la especie. En la actualidad existe un consorcio internacional, compuesto por grupos de trabajo de Francia, República Checa, Estados Unidos, Canadá y Australia que trabajan en conjunto para el desarrollo de una secuencia de alta calidad del genoma de la especie.

Por el momento, el genoma ha sido caracterizado con distintos tipos de marcadores, RFLP, RAPD, SSR, AFLP, SNP, etc. Al menos 60 mapas genéticos han sido construidos para distintas poblaciones F_2 o RIL, abarcando desde 13 hasta 8.503 marcadores, con longitudes que variaron entre 437,2 y 2.686 cM (Tabla 1). Algunos marcadores resultaron comunes entre los distintos mapas correspondientes a distintas poblaciones, lo que permitió la integración de los mapas y el desarrollo de mapas consenso para la especie (Tabla 2).

4.11 QTLs asociados a caracteres agronómicos en *Pisum sativum*

En comparación con otros cultivos económicamente importantes se han reportado pocos estudios de caracteres cuantitativos en arveja y los avances al respecto son aún muy limitados (Smýkal y Konecná, 2014). En la Tabla 1 se muestran los caracteres que han sido mapeados con los mapas de ligamiento disponibles por el momento.

Los primeros análisis de QTL se realizaron para peso de semilla con un mapa realizado en base a dos poblaciones segregantes con 101 RFLP, 58 RAPD y 40 AFLP (Timmerman-Vaughan *et al.*, 1996). Los mismos autores mapearon QTLs relacionados con los caracteres peso, número y rendimiento de semilla, evaluados durante tres años a campo (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005). Otros mapas genéticos basados en marcadores AFLP, RAPD y STS se utilizaron para detectar QTLs asociados a la resistencia al vuelco, altura de planta, resistencia a *Mycosphaerella*, rendimiento de grano, concentración de proteína en semilla y madurez (Tar'an *et al.*, 2003;

Tar'an *et al.*, 2004). Los marcadores de resistencia al vuelco fueron verificados y aplicados en programas de mejoramiento (Zhang *et al.*, 2006). Otros caracteres estudiados fueron el color verde en los cotiledones (McCallum *et al.*, 1997), número de nodos, precocidad, altura de planta y resistencia a *Ascochyta* (Dirlewanger *et al.*, 1994). Utilizando RILs evaluadas en cuatro ambientes se estudió el control de la resistencia al blanqueado, detectando QTLs que se expresaron en todos los ambientes, así como también QTLs específicos para un ambiente (Ubayasena *et al.*, 2010). Los mismos autores identificaron QTLs asociados a caracteres visuales de la semilla, como color y forma (Ubayasena *et al.*, 2011). Por otro lado, se han realizados estudios de QTL relacionados al tiempo de floración (Prioul *et al.*, 2004) con los cuales se han obtenido resultados similares a los alcanzados a través de efectos mutacionales (Weller *et al.*, 2009). Diversos estudios genéticos han identificado QTLs asociados con el contenido total de nitrógeno y de proteínas de las semillas (Burstin *et al.*, 2007; Irzykowska y Wolko, 2004; Tar'an *et al.*, 2004). Burstin *et al.* (2007) mapearon QTLs para el rendimiento de grano y para los componentes del rendimiento en cinco ambientes diferentes detectando 261 QTLs considerando el total de los ambientes. Recientemente, Bourion *et al.* (2010), Krajewski *et al.* (2012) y Klein *et al.* (2014) trabajaron con caracteres relacionados a rendimiento de grano. En la Tabla 3 se detallan las características de los QTLs que han sido encontrados previamente para los caracteres evaluados en esta tesis. Se puede observar que los avances al respecto son aún muy limitados.

POBLACIÓN F ₂							
<i>Cruza original</i>	<i>N° de individuos</i>	<i>N° de GL</i>	<i>N° de marcadores</i>	<i>Tipo de marcadores</i>	<i>Longitud del mapa (cM)</i>	<i>Caracteres mapeados</i>	<i>Referencias</i>
Erygel × 661	174	12	69	RFLP, RAPD	550	Altura de planta, días a floración, número de nodos, resistencia a <i>Ascochyta</i>	(Dirlewanger <i>et al.</i> , 1994)
Primo × OSU442-15	102	14	199	RFLP, RAPD, AFLP	1.510§	Peso semilla	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 1996)
Primo × OSU442-15	102	11	199	RFLP, RAPD	1.510§	Color de semilla	(McCallum <i>et al.</i> , 1997)
Vinco × Hurst's Greenshaft	—	—	—	isoenzimas	—	Resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Pisi</i>	(Hunter <i>et al.</i> , 2001)
Partridge × Early Onward	—	—	—	isoenzimas	—	Resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Pisi</i>	(Hunter <i>et al.</i> , 2001)
A26 × Rovar	148	13	99	AFLP, RAPD	930§	Resistencia a <i>Ascochyta</i>	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2004)
Primo × OSU442-15	227	11	108	RFLP, RAPD, AFLP	1.369§	Peso semilla seco, rendimiento de semilla, componentes de rendimiento, nudos a floración, números de nodos totales	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
IFPI3260 × IFPI3251	94	9	146	RAPD, SSR	1.283,3	Resistencia a <i>Uromyces pisi</i> (Pers.) Wint.	(Barilli <i>et al.</i> , 2010)
NGB5839 × JI1794a	92	—	—	—	—	Nodo a primera flor	(Weller <i>et al.</i> , 2012)
Pennant × ATC113	188	9	155	SSR	2.686	Resistencia a <i>Bruchus pisorum</i>	(Aryamanesh <i>et al.</i> , 2014)
G0003973 × G0005527	190	11	157	SSR	1.518	—	(Sun <i>et al.</i> , 2014)
DDR11 x Zav25	45	7	112	SRAP	528,8	-	(Guindon <i>et al.</i> , 2016)
POBLACIÓN RIL							
<i>Cruza original</i>	<i>N° de individuos</i>	<i>N° de GL</i>	<i>N° de marcadores</i>	<i>Tipo de marcadores</i>	<i>Longitud del mapa (cM)</i>	<i>Caracteres mapeados</i>	<i>Referencias</i>
JI281 × JI399	71	10	151	RFLP, marcadores morfológicos y proteínas de reserva	1.700§	-	(Ellis <i>et al.</i> , 1992)
JI15 × JI1194	50	10	65	RFLP	-	—	(Ellis <i>et al.</i> , 1992; Hall <i>et al.</i> , 1997)
JI15 × JI61	38	13	51	RFLP	-	—	(Ellis <i>et al.</i> , 1992; Hall <i>et al.</i> , 1997)
JI1201 × JI813	48	3	13	RFLP	—	—	(Ellis <i>et al.</i> , 1992; Hall <i>et al.</i> , 1997)

JI 1794 × Slow	51	14	200	RAPD, AFLP, RFLP	1.289§	Peso de la semilla seca	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 1996)
JI15 × JI399	-	7	-	RFLP, marcadores morfológicos y proteínas de reserva	1.400§	-	(Hall <i>et al.</i> , 1997)
JI281 × JI399	-	9	-	RFLP, marcadores morfológicos y proteínas de reserva	2.300§	-	(Hall <i>et al.</i> , 1997)
Térèse × K586b	139	9	256	RAPD, RFLP, marcadores morfológicos	1.139	-	(Laucou <i>et al.</i> , 1998)
MN313 × OSU1026	45	-	-	Isoenzimas, STS, RAPD	-	Tolerancia a <i>Aphanomyces euteiches</i>	(Weeden <i>et al.</i> , 2000)
Wt10245 × Wt11238	104	9	204	Marcadores morfológicos, isoenzimas, AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD	2.416	Longitud de hoja, número de internodo	(Irzykowska <i>et al.</i> , 2002)
A88 × Rovar	133	11	96	RAPD, AFLP, RFLP, SCARS	1.050§	Resistencia a <i>Ascochyta</i> , madurez reproductiva de la planta	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2002)
MN313 × JI 1794	47	9	242	RAPD, SSR	-	Dehiscencia de vaina	(Weeden <i>et al.</i> , 2002)
Puget × 90-2079	127	13	324	AFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, STS, isoenzimas	1.094	Resistencia parcial a <i>Aphanomyces euteiches</i>	(Pilet-Nayel <i>et al.</i> , 2002)
Carneval × MP1401	88	10	207	AFLP, RAPD, STS	1.274§	Altura de planta, Resistencia a <i>Mycosphaerella</i>	(Tar'an <i>et al.</i> , 2003)
Wt10245 × Wt11238	104	9	204	Marcadores morfológicos, isoenzimas, AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD	2.416	Componentes de rendimiento, concentración de proteína en la semilla	(Irzykowska y Wolko, 2004)
JI296 × DP	135	7	206	SSR, RAPD, STS	1.061	Resistencia a <i>Mycosphaerella pinodes</i> , altura de planta, fecha a floración	(Prioul <i>et al.</i> , 2004)
Carneval × MP1401	88	10	207	AFLP, RAPD, STS	1.274§	Rendimiento de grano, concentración de proteína en la semilla, días a madurez	(Tar'an <i>et al.</i> , 2004)
Térèse × K586b	139	7	363	SSR, SNP, marcadores morfológicos	1.458	Componentes de rendimiento, contenido proteico de la semilla, número y volumen de células de cotiledón, fecha a floración, altura de planta, número de ramas basales, biomasa, contenido de nitrógeno, índice de cosecha	(Burstin <i>et al.</i> , 2007)
“Afghanistan” (sym2) × A1078-239	19	-	-	-	-	Tolerancia a <i>Fusarium</i>	(Weeden y Porter, 2007)
CMG × PI 220174	225	-	-	-	-	Tolerancia a <i>Fusarium</i>	(Weeden y Porter, 2007)
Champagne × Terese	164	7	213	SSR, SNP	1.419	Respuesta al fotoperíodo, tolerancia al frío	(Lejeune-Henaut <i>et al.</i> , 2008)
Champagne × Terese	164	7	213	SSR, SNP	1.419	Respuesta al fotoperíodo, tolerancia al frío, contenido de azúcar, contenido de Rubisco	(Dumont <i>et al.</i> , 2009)

Ballet × Cameor	207	7	152	SSR	1.140	Fecha a floración, apariencia de la hoja eficiencia de uso de la radiación, área de la hoja, contenido de clorofila de la hoja, longitud del tallo, peso de la semilla, índices de nutrición de la planta (biomasa, contenido de nitrógeno, eficiencia de nodulación y fijación de Nitrógeno)	(Bourion <i>et al.</i> , 2010)
China × Cameor	91	8	91	SNP	677§	-	(Deulvot <i>et al.</i> , 2010)
Orb × CDC Striker	90	7	224	SSR, AFLP	890	Resistencia al blanqueado	(Ubayasena <i>et al.</i> , 2010)
VavD265 × Ballet	180	-	-	PQL (proein quality loci)	-	Contenido y calidad de las proteínas de la semilla	(Bourgeois <i>et al.</i> , 2011)
Ballet × Cameor	180	-	-	PQL (proein quality loci)	-	Contenido y calidad de las proteínas de la semilla	(Bourgeois <i>et al.</i> , 2011)
VavD265 × Cameor	180	-	-	PQL (proein quality loci)	-	Cantidad y calidad de proteína de la semilla	(Bourgeois <i>et al.</i> , 2011)
Carman × Rewarde	71	-	-	SSR	-	Resistencia a <i>Fusarium</i>	(Feng <i>et al.</i> , 2011)
Baccara × 552; DSP × 90-2131c; Baccara × PI180693	178-178	7	224	SSR, RAPD, RGA	1.652	Resistencia a <i>Aphanomyces</i>	(Hamon <i>et al.</i> , 2011)
HUVP 1 × FC 1	136	7	57	SSR, STS, RAPD	634	Resistencia a <i>Uromyces fabae</i> (Pers.) de-Bary	(Rai <i>et al.</i> , 2011)
Orb × CDC Striker	90	7	224	SSR, AFLP	890	Caracteres visuales de semilla	(Ubayasena <i>et al.</i> , 2011)
Alfetta × CDC Bronco	92	11	223	SSR, AFLP	450	Caracteres visuales de semilla	(Ubayasena <i>et al.</i> , 2011)
P665 × Messire	111	9	246	RAPD, STS, EST	1.214	Resistencia a <i>Mycosphaerella pinodes</i>	(Fondevilla <i>et al.</i> , 2012)
P665 × Messire	111	9	303	RAPD, STS, EST, SSR	1.188,97	Resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i>	(Fondevilla <i>et al.</i> , 2012)
Wt10245 × Wt11238	101	12	191	Marcadores morfológicos, isoenzimas, AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD, SSR	1.086	Longitud de hoja, número de internodos, componentes de rendimiento, concentración de proteína en la semilla	(Krajewski <i>et al.</i> , 2012)
Wt11238 × Wt3557	110	11	91	Marcadores morfológicos, isoenzimas, AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD, SSR	853	Componentes de rendimiento, concentración de proteína en la semilla	(Krajewski <i>et al.</i> , 2012)
Shawnee × Bohatyr	187	8	272	SSR, RAPD, marcadores morfológicos, isoenzimas	1.716	Resistencia parcial a <i>Fusarium</i>	(McPhee <i>et al.</i> , 2012)
Baccara × 552; DSP × 90-2131c; Baccara × PI180693	178-110-178	7	619	SSR, RAPD, AFLP, STS	1.513	Resistencia a <i>Aphanomyces</i> , precocidad, altura de planta	(Hamon <i>et al.</i> , 2013)
Kaspa × Parafield	134	9	458	SNP, SSR	1.916	Tolerancia a la salinidad	(Leonforte <i>et al.</i> , 2013)
China × Cameor	129	7	679	SNP	947,1§	Fecha a floración, resistencia al frío, tipo de ramificación, área de la hoja, contenido de clorofila de la hoja, altura de planta, componentes de rendimiento, biomasa, índice de cosecha y contenido proteico de la semilla	(Klein <i>et al.</i> , 2014)

Kaspa × Yarrum	106	13	428	SSR, SNP	1.910	Resistencia a Oídio	(Sudheesh <i>et al.</i> , 2014)
Kaspa × ps1771	106	9	451	SSR, SNP	1.545	Resistencia a Oídio, tolerancia a boron	(Sudheesh <i>et al.</i> , 2014)
1-2347-144 × CDC Meadowd	159	16	367	SNP	437,2	Concentración de ácido fítico, biodisponibilidad de hierro	(Shunmugam <i>et al.</i> , 2015)
Baccara x PI180693	48	7	64.263	SNP	1.027	-	(Boutet <i>et al.</i> , 2016)

Tabla 1. Mapas construidos con poblaciones biparentales en *Pisum Sativum* y QTLs (quantitative trait loci) posicionados en estos mapas (Adaptado de (Smýkal y Konečná, 2014; Tayeh *et al.*, 2015b). §Mapas desarrollados con la función Haldane. AFLP: Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados); CAPS: Cleaved amplified polymorphic sequence (Secuencia polimórfica amplificada y cortada); EST: Expressed sequence tag (Marcador de secuencia expresada); ISSR: Inter simple sequence repeat (Secuencias simples internas repetidas); PQL: Protein quantity loci (Loci de cantidad de proteína); RAPD: Random amplified polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar); RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción); RGA. Resistance gene analogues (Genes análogos de Resistencia); SCARS: Sequence-characterized amplified region (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas); SNP: Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único); SRAP: Sequence related amplified polymorphism (Polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas); SSR: Simple sequence repeat (Microsatélites); STS: Sequence-tagged site (Sitio de secuencia marcada).

MAPAS CONSENSO						
<i>Cruza original</i>	<i>N° de individuos</i>	<i>N° de GL</i>	<i>N° de marcadores</i>	<i>Tipo de marcadores</i>	<i>Longitud del mapa</i>	<i>Referencias</i>
J11794 × Slow	51	7	850	RFLP, isoenzimas, RAPD, SSR	800	(Weeden <i>et al.</i> , 1998)
Terese × K586; Champagne × Terese; Shawnee × Bohatyr	490	7	462	SSR	1430	(Loridon <i>et al.</i> , 2005)
Terese × K586; Champagne × Terese	303	7	363	SSR, SNP	1458§	(Aubert <i>et al.</i> , 2006)
Terese × K586; Terese × Champagne; China × Cameor; Cameor × VavD265; Cameor × Ballet; Ballet × VavD265	1.022	7	536	SSR, SNP	1389	(Bordat <i>et al.</i> , 2011)
Baccara × PI 180693; Baccara × 552	356	7	224	SSR, RAPD, RGA	1652	(Hamon <i>et al.</i> , 2011)
Baccara × PI 180693; Baccara × 552; DSP × 90-2131; Puget × 90-2079	594	7	619	SSR, RAPD, AFLP, STS	1513	(Hamon <i>et al.</i> , 2013)
J1296 × DP; Champagne × Terese; China × Cameor; Baccara × PI180693	360	7	2.070	SNP	1255	(Duarte <i>et al.</i> , 2014)
Orb × CDC Striker; Carrera × CDC Striker; 1-2347-144 × CDC Meadow; Alfetta × P651; China × Cameor	586	7	939	SNP	771.6	(Sindhu <i>et al.</i> , 2014)
Kaspa × Yarrum; Kaspa × ps1771; Kaspa × Parafield	–	7	764	SSR, SNP	2555	(Sudheesh <i>et al.</i> , 2014)
Champagne × Terese; VavD265 × Cameor; Ballet × Cameor; VavD265 × Ballet; Cameor × Melrose; Kazar × Cameor; Kazar × Melrose; China × Cameor; Cameor × Sommette; Cameor × Cerise; Baccara × PI180693; J1296 × DP	1.384	7	15.079	SNP	794.9§	(Tayeh <i>et al.</i> , 2015a)

Tabla 2. Mapas consenso desarrollados en *Pisum Sativum* (Adaptado de Tayeh *et al.*, 2015). §Mapas desarrollados con la función Haldane. AFLP: Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados); RAPD: Random amplified polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar); RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción); RGA: Resistance gene analogues (Genes análogos de Resistencia); SNP: Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único); SSR: Simple sequence repeat (Microsatélites); STS: Sequence-tagged site (Sitio de secuencia marcada).

<i>Caracteres</i>	<i>Población evaluada</i>	<i>Mapa utilizado</i>	<i>Método</i>	<i>Ambientes evaluados</i>	<i>GL</i>	<i>R²</i>	<i>Número de QTLs</i>	<i>Referencia</i>
Peso de semilla	102 F ₂ : Primo × OSU442-15	199 RAPD, AFLP, RFLP; 1.510 cM	IM	1 año a campo	3,4,5	0.13–0.26	3	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 1996)
Peso de semilla	51 RIL: J1 1794 × Slow	200 RAPD, AFLP, RFLP; 1.289 cM	Análisis simple	1 año en invernadero	1,3,7	–	7	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 1996)
Número de semilla	227 F ₂ : Primo × OSU442-15	108 RAPD, AFLP, RFLP; 1.396 cM	CIM	3 años a campo	1,2,3,4,7	0.05–0.27	9	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
Altura de planta	88 RIL: Carneval × MP1401	207 AFLP, RAPD, STS; 1.274 cM	CIM	11 ambientes a campo	3, GL no asignados	0.06–0.47	3	(Tar'an <i>et al.</i> , 2003)
Número de semilla	114 F ₂ , 104 RIL: Wt10245 × Wt11238	240 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD; 2.416 cM	IM	1 año a campo	1,2,3,4,5,6,7	0.10–0.55	8	(Irzykowska y Wolko, 2004)
Peso de semilla	114 F ₂ , 104 RIL: Wt10245 × Wt11238	240 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD; 2.416 cM	IM	1 año a campo	1,2,3,5	0.10–0.24	7	(Irzykowska y Wolko, 2004)

Rendimiento de semilla	114 F ₂ , 104 RIL: Wt10245 × Wt11238	240 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD; 2.416 cM	IM	1 año a campo	1,2,3,4,7	0.09–0.47	9	(Irzykowska y Wolko, 2004)
Número de vainas	114 F ₂ , 104 RIL: Wt10245 × Wt11238	240 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD; 2.416 cM	IM	1 año a campo	1,2,3,4,5,7	0.12–0.55	7	(Irzykowska y Wolko, 2004)
Rendimiento de semilla	88 RIL: Carneval × MP1401	207 AFLP, RAPD, STS; 1.274 cM	CIM	13 ambientes a campo	2,6,7	0.39	4	(Tar'an <i>et al.</i> , 2004)
Peso de semilla	227 F ₂ : Primo × OSU442-15	108 RAPD, AFLP, RFLP, 1.396 cM	CIM	3 años a campo	1,3,4,5,7	0.03–0.19	9	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
Rendimiento de semilla	227 F ₂ : Primo × OSU442-15	108 RAPD, AFLP, RFLP, 1.396 cM	CIM	3 años a campo	3,4,7	0.05–0.15	4	(Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
Altura de planta	139 RIL: Térèse × K586b	363 SSR, SNP; 1.458 cM	CIM	5 años a campo	-	0.09–0.63	6	(Burstin <i>et al.</i> , 2007)
Número de semilla	139 RIL: Térèse × K586b	363 SSR, SNP; 1.458 cM	CIM	5 años a campo	1,3,5,7	0.10–0.44	9	(Burstin <i>et al.</i> , 2007)
Peso de semilla	139 RIL: Térèse × K586b	363 SSR, SNP; 1.458 cM	CIM	5 años a campo	1,3,4,5,6,7	0.09–0.31	22	(Burstin <i>et al.</i> , 2007)
Rendimiento de semilla	139 RIL: Térèse × K586b	363 SSR, SNP; 1.458 cM	CIM	5 años a campo	1,3,4,7	0.09–0.53	6	(Burstin <i>et al.</i> , 2007)
Número de semilla	207 RIL: Ballet x Cameor	152 SSR; 1.140 cM	CIM	2 años a campo,	1,3,4,5,7	10–17,3	6	(Bourion <i>et al.</i> , 2010)
Peso de semilla	207 RIL: Ballet x Cameor	152 SSR; 1.140 cM	CIM	2 años a campo,	1,2,3,5,7	8,8–18,3	9	(Bourion <i>et al.</i> , 2010)
Rendimiento de semilla	110 RIL: Wt11238 × Wt3557, 101 RIL: Wt10245 × Wt11238	91 Y 191 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD, SSR; 853 Y 1.086 cM	CIM	3 años a campo	2,5	-	6	(Krajewski <i>et al.</i> , 2012)
Número de semilla	110 RIL: Wt11238 × Wt3557, 101 RIL: Wt10245 × Wt11238	91 Y 191 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD, SSR; 853 Y 1.086 cM	CIM	3 años a campo	2	-	8	(Krajewski <i>et al.</i> , 2012)
Peso de semilla	110 RIL: Wt11238 × Wt3557, 101 RIL: Wt10245 × Wt11238	91 Y 191 AFLP, ISSR, CAPS, STS, RAPD, SSR; 853 Y 1.086 cM	CIM	3 años a campo	1,2,3,5	-	6	(Krajewski <i>et al.</i> , 2012)
Número de vainas	129 RIL China x Cameor	679 SNP, 947,1 cM	CIM	6 años a campo	3	0.13–0.35	5	(Klein <i>et al.</i> , 2014)
Número de semillas	129 RIL China x Cameor	679 SNP, 947,1 cM	CIM	6 años a campo	3,4	0.11–0.28	6	(Klein <i>et al.</i> , 2014)
Semillas por vaina	129 RIL China x Cameor	679 SNP, 947,1 cM	CIM	6 años a campo	1,4,7	0.19–0.29	5	(Klein <i>et al.</i> , 2014)
Peso de semilla	129 RIL China x Cameor	679 SNP, 947,1 cM	CIM	6 años a campo	1,2,3,6	3,1–5,3	9	(Klein <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 3. QTLs detectados para componentes de rendimiento en arveja. CIM: Composite Interval mapping (Mapeo por intervalo compuesto); IM: Interval mapping (Mapeo por intervalos); AFLP: Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados); CAPS: Cleaved amplified polymorphic sequence (Secuencia polimórfica amplificada y cortada); ISSR: Inter simple sequence repeat (Secuencias simples internas repetidas); RAPD: Random amplified polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar); RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción); SNP: Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único); SSR: Simple sequence repeat (Microsatélites); STS: Sequence-tagged site (Sitio de secuencia marcada).

5. HIPÓTESIS

Mediante la combinación de diversas técnicas moleculares, tales como SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) y GBS (*Genotyping by sequencing*), es posible generar un elevado número de marcadores distribuidos regularmente a lo largo de todo el genoma de *Pisum sativum* L., de manera tal que permitan generar un mapa de ligamiento de la especie e identificar QTLs (*Quantitative Traits Loci*) asociados a características de interés agronómico facilitando los procesos de selección en los programas de mejoramiento genético.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Establecer relaciones de ligamiento genético en *Pisum sativum* L. a fin de desarrollar un nuevo mapa de ligamiento para la especie que permita la identificación y localización de QTLs asociados a caracteres de importancia agro-económica.

6.2 Objetivos específicos

- Desarrollar una población de mapeo de la especie *Pisum sativum* L. a partir del cruzamiento entre dos variedades lineales con comportamiento diferencial para caracteres cuantitativos.
- Evaluar cada individuo de la población de mapeo F₂ a nivel productivo y molecular.
- Evaluar a nivel productivo a las familias F_{2:3}, derivadas de cada individuo F₂ en dos ambientes diferentes.
- Analizar parámetros genéticos sobre los caracteres evaluados que faciliten el establecimiento de criterios de selección para el mejoramiento de la especie.
- Seleccionar un grupo de marcadores moleculares polimórficos entre ambos progenitores, que presenten segregación de tipo mendeliana en la población F₂.
- Generar un mapa de ligamiento utilizando una combinación de marcadores moleculares SRAP, SSR y SNP.
- Confrontar el mapa obtenido con los mapas publicados previamente para la especie, comparando el orden y las distancias entre los marcadores.
- Identificar y mapear QTLs ligados a los caracteres de interés agronómico relacionados con el rendimiento, a fin de acelerar los procesos selectivos en la especie en estudio.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Construcción de la población de mapeo

Se utilizaron las plantas F₂ derivadas del cruzamiento entre las variedades Explorer y DDR14 (Figura 5). Dichos progenitores fueron seleccionados por ser de diferentes orígenes geográficos y por presentar divergencias a nivel morfológico y productivo de acuerdo a lo reportado por Almirón (2015) (Tabla 4). Asimismo, Espósito *et al.* (2014), evaluaron 213 marcadores polimórficos SRAP obtenidos a partir de 18 combinaciones de cebadores, diez marcadores SSR y 14 caracteres morfovegetativos. En base a estos datos ambas variedades fueron incluidas en diferentes grupos al ser sometidas a análisis de conglomerados junto a otras 21 accesiones.

	DDR14	Explorer
Origen	India	Suecia
Color de grano	Amarillo	Verde
Presencia de folíolos	Sí	No
Calibre de grano	Grande: 0,79 cm	Medio: 0,65 cm
Tamaño de vainas	Grande: 8,2 cm de largo y 1,3 cm de ancho	Medio: 6,5 cm de largo y 1,9 cm de ancho
Potencial de rendimiento	Elevado: 0,8 Kg/parcela de 20 plantas	Medio-bajo: 0,4 Kg/parcela 20 plantas

Tabla 4. Características de los progenitores utilizados para generar la población de mapeo.

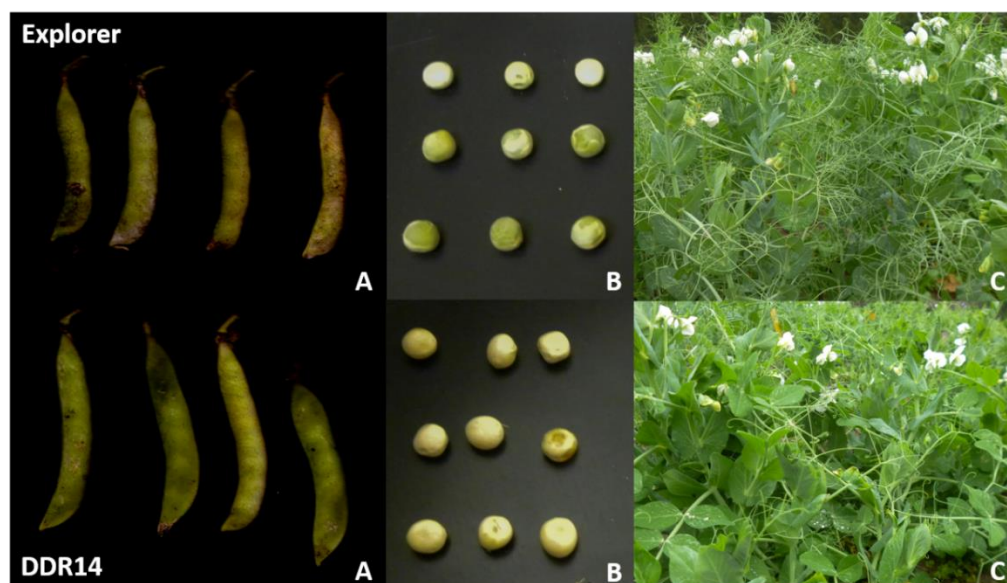


Figura 5. Progenitores DDR14 y Explorer sembrados en el año 2015. Se pueden observar la diferencia en el tamaño de las vainas (A), en el tamaño y color de las semillas (B) y la presencia de folíolos en DDR14 y de zarcillos en Explorer (C).

7.2 Evaluación fenotípica

7.2.1 *Diseño experimental*

Doscientas semillas F_2 fueron sembradas el 24 de junio de 2013, en la Sección de Horticultura, del Campo Experimental J.F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (33°1 LS y 60°53 LO) en cuatro surcos de 5 m de longitud, aplicando un marco de plantación de 70 cm entre surcos y 10 cm entre plantas dentro del surco. Se utilizó un sistema de riego por goteo y se efectuaron tratamientos de α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina (Trifluralina) como herbicida pre-emergente e incorporado al suelo, para evitar la competencia con malezas. Simultáneamente y en un surco apareado, se sembraron dos repeticiones de diez plantas de cada uno de los parentales utilizados en el cruzamiento.

De las 200 semillas F_2 sembradas, solo 110 germinaron, desarrollaron y generaron una cantidad suficiente de semilla como para pasar a la siguiente generación. Las 110 familias $F_{2:3}$ fueron sembradas y evaluadas durante los años 2014 y 2015 (fechas de siembra 26/06 y 06/07, respectivamente) utilizando un diseño completamente aleatorizado con dos repeticiones de diez plantas por familia. Simultáneamente y en el mismo marco de plantación, se sembró una muestra de diez semillas de ambas líneas progenitoras y de la generación F_1 .

7.2.2 *Caracteres analizados*

En cada una de las generaciones y años, se evaluaron características productivas de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV, 2009). En el caso de los individuos F_2 las evaluaciones se realizaron a nivel de planta individual, mientras que para las familias $F_{2:3}$ se determinaron los valores promedios de cada parcela, al igual que para la F_1 y los progenitores.

Los caracteres evaluados fueron:

- Días a 50 % de floración (DF): período comprendido desde la siembra hasta el 50 % de inicio de floración de la parcela. Se consideró el inicio de la floración cuando aparece en la planta una flor abierta.
- altura de planta al momento de la cosecha (cm) (AP),
- número de vainas por planta (NV),

- número de semillas por planta (NS),
- longitud de la vaina (cm) (LV),
- ancho de la vaina (cm) (AV),
- número de semillas por vainas (SV),
- diámetro de la semilla (cm) (DS),
- peso promedio de las semillas de cada planta, determinado como el peso total de las semillas de cada planta dividido por el número de semillas producidas (g) (PS).

7.3 Análisis Estadísticos

7.3.1 Evaluación de los progenitores DDR14 y Explorer y de la generación F_1

Los análisis detallados a continuación se efectuaron a través del programa estadístico *Info-Gen* (Balzarini y Di Renzo, 2003).

Se comprobó el supuesto de distribución normal para cada carácter por medio de la prueba de Shapiro-Wilk modificada por Mahibbur y Govindarajulu (1997) ($W > 0,85$).

Se llevó a cabo un Análisis de Variancia (ANDEVA), a dos criterios de clasificación, a través de los ambientes evaluados para determinar la significancia de los efectos del genotipo, del ambiente y de la interacción genotipo x ambiente (IGA) en la diferencia observada entre los progenitores.

Se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

y_{ijk} : cada una de las variables de respuesta en la caracterización;

μ : media general;

α_i : efecto del factor genotipo, $i = 1 \dots g$, siendo g = número de genotipos = 2;

β_j : efecto del factor ambiente, $j = 1 \dots a$, a = número de ambientes = 3, $a = 1, 2$ y 3 para los años 2013, 2014 y 2015.

γ_{ij} : interacción genotipo-ambiente;

ε_{ijk} : error experimental, $k = 1 \dots r$, r = número de repeticiones = 2.

Todos los efectos fueron considerados aleatorios.

Se analizaron los datos obtenidos dentro de cada uno de los años evaluados (2013, 2014 y 2015): se compararon los valores promedios de los progenitores mediante la prueba T de Student ($p < 0,05$) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los mismos.

Por otra parte, se determinó la presencia de heterosis mediante la comparación de los valores promedio de la generación F_1 con los del progenitor superior en cada uno de los ambientes (años) evaluados (2014 y 2015).

7.3.2 *Evaluación de la población F_2 y de las familias $F_{2:3}$*

Los análisis detallados a continuación se efectuaron a través del programa estadístico *Info-Gen* (Balzarini y Di Renzo, 2003).

Se comprobó el supuesto de distribución normal para cada carácter por medio de la prueba de Shapiro-Wilk modificada por Mahibbur y Govindarajulu (1997) ($W > 0,85$).

7.3.2.1 Evaluación de la interacción genotipo por ambiente en las familias $F_{2:3}$

Se llevaron a cabo ANDEVA, a dos criterios de clasificación, a través de los ambientes evaluados para determinar la significancia de los efectos del genotipo, del ambiente y de la interacción genotipo (familia) x ambiente (IGA).

Se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

y_{ijk} : cada una de las variables de respuesta en la caracterización;

μ : media general;

α_i : efecto del factor genotipo, $i = 1 \dots g$, siendo g = número de genotipos = 110;

β_j : efecto del factor ambiente, $j = 1 \dots a$, a = número de ambientes = 2;

γ_{ij} : interacción genotipo-ambiente;

ε_{ijk} : error experimental, $k = 1 \dots r$, r = número de repeticiones = 2.

Todos los efectos fueron considerados aleatorios.

7.3.2.2 Análisis por ambiente de los individuos F_2 y las familias $F_{2:3}$

Se analizaron los datos obtenidos dentro de cada ambiente para los individuos F_2 (año 2013) y sus correspondientes familias $F_{2:3}$ (años 2014 y 2015).

Se calcularon los valores promedios, mínimos y máximos para los caracteres evaluados en cada ambiente. Se determinó el coeficiente de variación (CV), que puede ser utilizado como una forma de medir la variabilidad entre las plantas F_2 y entre las familias $F_{2:3}$.

Se realizaron ANDEVA a un criterio de clasificación para cada carácter en cada uno de los años de evaluación (2014 y 2015) para analizar la variabilidad existente entre las familias $F_{2:3}$. Se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ik} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ik}$$

dónde:

y_{ik} : cada una de las variables de respuesta en la caracterización;

μ : media general;

α_i : efecto del factor genotipo, $i = 1 \dots g$, siendo g = número de familias = 110

ε_{ik} : error experimental, $k = 1 \dots r$, r = número de repeticiones = 2

A partir del ANDEVA se estimaron para cada uno de los ambientes los componentes de variancia entre (σ_e^2) y dentro (σ_d^2) de las familias y se calculó la heredabilidad en sentido estricto (h^2) de acuerdo a la fórmula establecida por Cahaner y Hillel (1980): $h^2 = \frac{3}{2} \frac{\sigma_e^2}{(\sigma_e^2 + \sigma_d^2)}$

El error estándar de la heredabilidad se estimó a partir de la variancia del coeficiente de correlación intraclase (Falconer, 1960).

En cada uno de los ambientes evaluados se identificaron segregantes transgresivos como aquellos individuos F_2 o familias $F_{2:3}$ cuyos valores medios excedían al padre de mayor valor en, al menos, dos desvíos estándares, calculando el desvío estándar en base a la descendencia (Connor *et al.*, 2005).

7.3.2.3 Influencia de las condiciones ambientales en el comportamiento de las familias $F_{2:3}$

Los datos correspondientes a los años 2014 y 2015 respecto al volumen de precipitaciones totales entre junio y noviembre (período entre la siembra y cosecha del cultivo) y temperaturas medias desde el 20 de setiembre al 10 de noviembre (etapa de llenado de granos en el cultivo) fueron obtenidos de la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R.

Se determinó si existían diferencias significativas para cada una de las familias entre los años evaluados comparando los valores promedios de todas las variables entre ambos años mediante la prueba T de Student ($p < 0,05$).

7.3.3 Correlaciones fenotípicas y genéticas entre variables

La estimación de los coeficientes de correlación fenotípicos (r_F) y genéticos (r_G) para cada par de caracteres, se realizó mediante el uso del programa computacional GENES versión Windows (Cruz, 2001). El programa aplica las fórmulas clásicas de correlación:

Correlación fenotípica: $r_F(XY) = \text{COVF}(XY) / \text{SF}(X) \cdot \text{SF}(Y)$

Correlación genética: $r_G(XY) = \text{COVG}(XY) / \text{SG}(X) \cdot \text{SG}(Y)$

dónde: $\text{COV}(XY)$ son las covarianzas fenotípicas y genéticas entre los caracteres X e Y; $S(X)$ y $S(Y)$ son la desviaciones estándar fenotípicas y genéticas de X e Y.

Los coeficientes de correlación pueden tomar valores dentro del intervalo (-1, 1). Valores cercanos a 1 indican alta correlación lineal positiva y valores de r cercanos a -1 indican alta correlación lineal negativa. Si el coeficiente se aproxima a cero indica que no hay correlación lineal entre variables. Una vez estimados los coeficientes de correlación se confirmó la significancia estadística mediante una prueba T.

7.4 Evaluación molecular

Las técnicas moleculares descriptas en los puntos 7.4.1, 7.4.2 y 7.4.3 se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R., ubicada en la localidad de Zavalla, Provincia de Santa Fe.

7.4.1 Extracción del ADN

Hojas jóvenes de cada planta F_2 y de cada uno de los progenitores fueron recolectadas y almacenadas en freezer a -80°C . El ADN genómico total se extrajo partiendo de 0,10 g de tejido vegetal usando el método CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) descrito por Doyle y Doyle (1990) con las siguientes modificaciones: 1) luego de llevar a cabo la precipitación del ADN las muestras se dejaron a -20°C por 30 minutos 2) los últimos lavados se realizaron con etanol al 70 % y, 3) el pellet obtenido se resuspendió en agua destilada. Luego de un tratamiento con RNasa,

se evaluó la cantidad y calidad del ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Se comparó la intensidad de las bandas con un estándar de ADN (100 ng/μl) analizando las imágenes digitales de los geles con el programa GelAnalyzer v2010.

7.4.2 Marcadores SRAP

Se utilizaron un total de 50 combinaciones de cebadores SRAP (Tabla 5), generadas a partir de diez cebadores directos y diez cebadores reversos (Tabla 6), desarrollados por Li y Quiros (2001) y Lin et al. (2003). Las mismas fueron evaluadas en ambos parentales para identificar polimorfismos entre los mismos. Aquellas combinaciones con las que se obtuvieron bandas polimórficas entre los progenitores fueron posteriormente utilizadas en la evaluación de los individuos F₂.

La reacción de PCR (20 μl volumen final) consistió en 15 ng de ADN genómico, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de solución amortiguadora *Taq* ADN polimerasa y 1 unidad (U) de *Taq* ADN polimerasa (*Invitrogen*TM, 5U/μl).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCyclerTM (BIO-RAD). El protocolo de ciclado fue de: 5 min a 94 °C; 5 ciclos de tres pasos: 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 1 min a 72 °C; en los siguientes 35 ciclos la temperatura de hibridación se elevó a 50 °C; finalizando con un paso de elongación de 10 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron mezclados con 15 μl de solución amortiguadora de siembra (98 % (v/v) de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % (m/v) de azul de bromofenol y 0,01 % (m/v) de xylene cyanol) y resueltos por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % (m/v), de dimensiones de 0,15 x 340 x 500 mm, a 100 W durante un tiempo variable de entre tres a cuatro horas dependiendo del avance del frente de corrida, previa desnaturalización de los productos a 94 °C por 5 minutos.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante tinción con nitrato de plata al 1 % (m/v) siguiendo el protocolo de Bassam *et al.* (1991).

Se analizó cada combinación SRAP buscando bandas polimórficas entre los genotipos. Se asignó un valor de “1” para la presencia de banda y “0” para la ausencia de la misma. Los tamaños de las bandas se estimaron en base a un marcador de ADN de peso molecular de 100 pb a 1000 pb CienMarker (*Biodynamics*).

Combinaciones SRAP utilizadas			
Me1-Em1	Me3-Em4	Me6-Em6	Me8-Em8
Me1-Em2	Me3-Em5	Me6-Em7	Me8-Em9
Me1-Em3	Me4-Em1	Me6-Em8	Me8-Em10
Me1-Em4	Me4-Em2	Me6-Em9	Me9-Em6
Me1-Em5	Me4-Em3	Me6-Em10	Me9-Em7
Me2-Em1	Me4-Em4	Me7-Em6	Me9-Em8
Me2-Em2	Me4-Em5	Me7-Em7	Me9-Em9
Me2-Em3	Me5-Em1	Me7-Em8	Me9-Em10
Me2-Em4	Me5-Em2	Me7-Em9	Me10-Em6
Me2-Em5	Me5-Em3	Me7-Em10	Me10-Em7
Me3-Em1	Me5-Em4	Me8-Em6	Me10-Em8
Me3-Em2	Me5-Em5	Me8-Em7	Me10-Em9
Me3-Em3			Me10-Em10

Tabla 5. Combinaciones de cebadores SRAP utilizadas

Cebadores F	Secuencia	Cebadores R	Secuencia
Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
Me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
Me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
Me7	5'-TGAGTCCAAACCGGTTG-3'	Em7	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'
Me8	5'-TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	Em8	5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'
Me9	5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	Em9	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
Me10	5'-TGAGTCCAAACCGGGAC-3'	Em10	5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'

Tabla 6. Secuencia de cebadores SRAP utilizados

7.4.3 Marcadores SSR

Se probaron en los progenitores 49 SSR (Tabla 7), los cuales fueron desarrollados para la especie por Loidon *et al.* (2005). Aquellos que mostraron polimorfismo fueron evaluados luego en toda la población.

La reacción de PCR (25 µl volumen final) consistió en 20 ng de ADN genómico, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de solución amortiguadora *Taq* ADN polimerasa y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (PB-L, Productos Bio-Lógicos®). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). Se utilizó un protocolo de amplificación de aterrizaje (*touchdown*, TD) de: 5 min a 94 °C; seguido de 11 ciclos de tres pasos: 30 s a 94 °C, 30 s a 63 °C (para TD 63-58) o 55 °C (para TD 55-50) (decreciendo 0,5 °C en cada ciclo) y 1 min a 72 °C; posteriormente se realizaron 24 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a

58 °C o 50 °C (TD 63-58 y TD 55-50, respectivamente) y 1 min a 72 °C; finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron mezclados con 10 µL de solución amortiguadora de siembra (98 % (v/v) de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % (m/v) de azul de bromofenol y 0,01 % (m/v) de xylene cyanol), desnaturalizados a 94 °C durante 5 min y separados electroforéticamente a 100 W por dos horas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % (m/v). La visualización de los productos se realizó mediante tinción con nitrato de plata al 1 % (m/v) (Bassam *et al.*, 1991). Los tamaños de las bandas se estimaron en base a un marcador de ADN de peso molecular de 100 pb a 1000 pb CienMarker (*Biodynamics*).

SSR	Cebadores F	Cebadores R	TD
A9	5'-GTGCAGAAGCATTTGTTTCAGAT-3'	5'-CCCACATATATTTGGTTGGTCA-3'	58-63°C
AA5	5'-TGCCAATCCTGAGGTATTAACACC-3'	5'-CATTTTTGCAGTTGCAATTTTCGT-3'	58-63°C
AA18	5'-CTGTAGACCAAGCCAAAAGAT-3'	5'-TGAGACACTTTTGACAAGGAGG-3'	58-63°C
AA37	5'-TCCACCTTCAAAGTTGATACAGT-3'	5'-GGGCTTTTTAGCTTGTAGACCA-3'	50-55°C
AA92	5'-AAGGTCTGAAGCTGAACCTGAAGG-3'	5'-GCAGCCACAGAAGTGCTTCAA-3'	50-55°C
AA103	5'-AAGTGTGAAAGTTTGCCAGGTC-3'	5'-CGGGTACGGGTTATGTTGTC-3'	58-63°C
AA121	5'-TCCATACCTTAGTGTTAAA-3'	5'-ACTAATAAGGTAAACATGTG-3'	50-55°C
AA135	5'-CCGTTACACATCATTAAAGATG-3'	5'-TCCATATCCAGATTAGTCAGA-3'	50-55°C
AA153	5'-TTTGATAGTCCGACTTTTCCAT-3'	5'-GTGACAAAAGAATTCAAAACGC-3'	50-55°C
AA160	5'-AGATAGCATGAGAATGGTGGC-3'	5'-CTGCTCCAACACAAGATAAACA-3'	58-63°C
AA163.2	5'-TAGTTTCCAATTCAATCGACCA-3'	5'-AGTGTATTGTAAATGCACAAGGG-3'	50-55°C
AA189	5'-ATTTATCCTACACTTCCAGCCTA-3'	5'-GGATATACAACGTCACACTACCA-3'	50-55°C
AA200	5'-ACCGAAGAGCATTTCCTAAG-3'	5'-TCCATCAGTTCCTAATTCAT-3'	58-63°C
AA205	5'-TACGCAATCATAGAGTTTGGAA-3'	5'-AATCAAGTCAATGAAACAAGCA-3'	50-55°C
AA233	5'-TTAGCTTGAAGCTCACACAAG-3'	5'-ACACTAGCTACTACAAATGAAGGC-3'	58-63°C
AA278	5'-CCAAGAAAGGCTTATCAACAGG-3'	5'-TGCTTGTGTCAAGTGATCAGTG-3'	58-63°C
AA285	5'-TCGCCTAATCTAGATGAGAATA-3'	5'-CTTAACATTTTAGGTCTTGGAG-3'	50-55°C
AA335	5'-ACGCACACGCTTAGATGAAAT-3'	5'-ATCCACCATAAGTTTGGCATA-3'	58-63°C
AA355	5'-AGAAAAATTCTAGCATGATACTG-3'	5'-GGAAATATAACCTCAATAACACA-3'	50-55°C
AA399	5'-CCATTGGTATATGAAAGATCGCT-3'	5'-TCCCAATTAATATGGCTAGGCT-3'	58-63°C
AA460	5'-TGTCAGCTGAATTCACACTCTC-3'	5'-AAAGACCTCAAAGTGATGCGT-3'	50-55°C
AA475	5'-GTGCATGAAAAAGGGTCAAGA-3'	5'-CGATGTTGCCATTGATGAAGAC-3'	58-63°C
AA491	5'-GAGGTGGTGTGTAATTTGTG-3'	5'-CCTAATTTTACCCCTCTCTCT-3'	58-63°C
AA504	5'-TGAGTGCAGTTGCAATTTTCG-3'	5'-TCAGATGAAGAGCATGTGGG-3'	58-63°C
AB23	5'-TCAGCCTTTATCCTCCGAATA-3'	5'-GAACCTTGTGCAGAAGCATT-3'	58-63°C
AB25	5'-TTTTCACTCAAAACACTCGGCT-3'	5'-GAGTCCATTGCTGAAGGAGATT-3'	50-55°C
AB28	5'-CCTGAGTCATCACATAGGAGAT-3'	5'-GCAGAAGTATTTGACTTGATGGAA-3'	50-55°C
AB36	5'-GTCGGTGGCGACTCTTGCTA-3'	5'-GCAGAAGCATTGTG CAGTTGA-3'	58-63°C
AB53	5'-CGTCGTTGTTGCCGGTAG-3'	5'-AAACACGTCATCTCGACCTGC-3'	50-55°C
AB 133	5'-GCAGAAGCATTCATTGCGG-3'	5'-AACATGGAATCTCAACAAACGGA-3'	58-63°C
AB149	5'-ACAAAGGATGATGAAAGACCCG-3'	5'-TCATTACTCAAAGAATGCACCCAC-3'	58-63°C
AC58	5'-TCCGCAATTTGGTAACACTG-3'	5'-CGTCCATTCTTTTATGCTGAG-3'	58-63°C
AC74	5'-CCTTAGTGTTTCAACTC-3'	5'-ACAGAACCAAGTTATCAATA-3'	50-55°C
AC75	5'-CGCTCACCAAATGTAGATGATAA-3'	5'-TCATGCATCAATGAAAGTGATAAA-3'	50-55°C
AC76a	5'-CCCAATCCAATAAATAAAGAAA-3'	5'-AATGGTTGTTATGCCATTTT-3'	50-55°C
AD51	5'-ATGAAGTAGGCATAGCGAAGAT-3'	5'-GATTAAATAAAGTTTCGATGGCG-3'	50-55°C
AD56	5'-GAAACATTGGTTGAAGAGCGAG-3'	5'-GTTGTGCGGTGAACACAAGTAA-3'	58-63°C
AD59	5'-TTGGAGAATGTCTTCTTTAG-3'	5'-GTATATTTTCACTCAGAGGCAC-3'	50-55°C
AD61	5'-CTCATTCAATGATGATAATCCTA-3'	5'-ATGAGGTACTTGTGTGAGATAAA-3'	50-55°C

AD70	5'-CTGCTTGAGGGGTAGATTATTG-3'	5'-TTAGAAGCATCCACATTGAGTC-3'	50-55°C
AD146	5'-TGCTCAAGTCAATATATGAAGA-3'	5'-CAAGCAAATAGTTGTTTTGTTA-3'	50-55°C
AD147	5'-AGCCCAAGTTTCTTCTGAATCC-3'	5'-AAATTCGCAGAGCGTTTGTAC-3'	58-63°C
AD148	5'-GAAACATCATTGTGTCTTCTTG-3'	5'-TTCCATCACTTGATTGATAAAC-3'	50-55°C
AD159	5'-AGCTTGGAACCACAAGATTAGT-3'	5'-GTGAATGATAATTCTCACCTC-3'	58-63°C
AD171	5'-TGAGGGCAGACATACCCATAGC-3'	5'-CGGTGATCAAAGCAATCGACAA-3'	58-63°C
AD174	5'-GGAGGGATGATTCTAACAAGGT-3'	5'-AACTCCCCTCCTCGAACTATT-3'	50-55°C
AD186	5'-TCAATGACGTGTTGATCGAGGA-3'	5'-CCATGCTTTGCACCGAAAGTAA-3'	58-63°C
AD237	5'-AGATCATTTGGTGTTCATCAGTG-3'	5'-TGTTTAATACAACGTGCTCCTC-3'	50-55°C
D21	5'-TATTCTCCTCCAAAATTCCTT-3'	5'-GTCAAAATTAGCCAAATTCCTC-3'	50-55°C

Tabla 7. Secuencia de marcadores microsatélites y protocolo de temperatura utilizados.

7.4.4 Marcadores SNP identificados por la técnica GBS

Dado que en nuestra institución no disponemos del equipamiento requerido para realizar la técnica de GBS (secuenciador Illumina HiSeq2000), dicho protocolo se realizó en colaboración con el Dr. Krishna Kishore Gali de la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá), bajo la dirección del Dr. Tom Warkentin siguiendo el protocolo de Elshire *et al.* (2011), utilizando las enzimas de restricción *Pst* I y *Msp* I. Debido a cuestiones prácticas la secuenciación se llevó a cabo sobre 94 individuos de la población F₂ y los dos progenitores, utilizando 96 códigos de barra únicos para la secuenciación.

El análisis bioinformático de los datos de las librerías GBS también fue llevado a cabo por el Dr. Gali. Los datos fueron procesados para reducir los errores y duplicaciones, las secuencias fueron asignadas a cada uno de los individuos a través de los códigos de barra específicos y el set completo de secuencias fue examinado para encontrar secuencias polimórficas entre los progenitores, las que luego fueron evaluadas en toda la población. Las lecturas fueron procesadas inicialmente con Trimmomatic-0.33 (Bolger *et al.*, 2014), y mapeadas luego contra el borrador del genoma, proporcionado por el consorcio de secuenciación del genoma de arveja utilizando Bowtie2-2.2.5 (Langmead y Salzberg, 2012). Los SNPs fueron identificados y convertidos a formato VCF utilizando Samtools-1.1 y BCFtools-1.1 (Li *et al.*, 2009).

7.4.5 Registro de marcadores moleculares y análisis de segregación

Los perfiles generados por los marcadores SRAP fueron considerados como marcadores dominantes (presencia/ausencia de banda) y cada marcador/banda fue denominado de acuerdo a la combinación de cebadores utilizada para generarlo, seguido del PM estimado. Los marcadores microsatélites fueron considerados como marcadores codominantes y se identificaron de acuerdo al par de cebadores utilizados para su amplificación. Los marcadores SNP fueron considerados

codominantes e identificados a través de la palabra SNP, seguida del número de *scaffold* y la posición del nucleótido polimórfico.

Todos los marcadores e individuos que presentaron más de 50 % de datos perdidos fueron eliminados del análisis.

Los marcadores fueron codificados, de acuerdo a lo indicado en el manual de uso del programa de mapeo JoinMap v4 (Van Ooijen, 2006) para una población F₂. Una vez creado el archivo de datos en el programa JoinMap v4, éstos fueron sometidos a una prueba de χ^2 a fin de determinar si presentaban segregación de tipo mendeliana. La proporción de segregación esperada en la progenie es de 3:1 en el caso de marcadores dominantes o de 1:2:1 en el caso de marcadores codominantes. Los marcadores que presentaron un patrón de segregación mendeliano ($\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.05}$) o con una ligera desviación ($\chi^2_{\alpha=0.1} < \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$) fueron utilizados para la construcción del mapa. Los marcadores que presentaron una desviación de la segregación significativa ($\chi^2 > \chi^2_{\alpha=0.01}$) fueron incluidos en una segunda ronda de mapeo, sólo cuando su presencia no alteró el orden local de los marcadores previamente incluidos.

7.4.6 Construcción del mapa de ligamiento

El mapa de ligamiento fue construido aplicando el programa de mapeo JoinMap v4 (Van Ooijen, 2006). Los grupos de ligamiento (GL) se establecieron con un LOD_{min}=3.0; una vez efectuado el agrupamiento, el orden de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento se determinó con los parámetros de mapeo REC=0.40, LOD=1.0 y Jump=5. Las distancias de mapeo fueron estimadas en CentiMorgan aplicando la función de Kosambi. Los grupos de ligamiento fueron nombrados de acuerdo a los SSR presentes y graficados mediante el programa MapChart v2.1 (Voorrips, 2002).

7.5 Detección de QTLs

El análisis de QTLs se basa en la detección de asociaciones entre el fenotipo de los individuos y su genotipo determinado por los marcadores moleculares. Como datos fenotípicos, se han utilizado los valores individuales de las plantas F₂ y los valores de la descendencia F₃ en cada uno de los ambientes. Para manejar la gran cantidad de datos y estimaciones que requieren estos análisis, se han desarrollado diversos paquetes estadísticos específicos. En el presente trabajo de

tesis se utilizó el programa WinQTL Cartographer (Wang *et al.*, 2012), mediante el cual realizó el mapeo por intervalos compuesto (CIM). Se efectuó, en primer lugar, el análisis por prueba simple de marcador y el análisis por intervalo simple para detectar marcadores asociados a los caracteres que puedan actuar como cofactores al estimar la probabilidad de los QTLs. Estos cofactores se compararon con los seleccionados automáticamente por el programa a partir del método de regresión directo (“*forward*”, $p \leq 0.05$) para definir los marcadores utilizados en el modelo final. Se ha considerado la hipótesis tres, que asume la existencia tanto de efectos aditivos como dominantes. El genoma se escaneó a intervalos de 1 cM y se estimó la posición de los QTLs detectados, su efecto aditivo y dominante, así como el porcentaje de la variación fenotípica (R^2) explicada por cada uno. El umbral para determinar un QTL como significativo ha sido un LOD mayor a 2,5. La posición del QTL se estimó en el punto de mayor LOD y se consideró un intervalo de confianza del 95 % definido como el intervalo de mapa correspondiente a una disminución de 1-LOD a cada lado del punto de máxima significancia estadística. Los mapas de ligamiento y los QTLs detectados se han representado gráficamente mediante el programa MapChart (Voorrips, 2002). Los QTLs se nombraron a partir de letras indicadoras del carácter asociado, seguidas por un número arábigo. La variación fenotípica explicada por todos los QTLs detectados para un mismo carácter se determinó mediante un análisis de regresión múltiple, utilizando como variables explicativas los marcadores más cercanos para cada QTL putativo utilizando el programa J/qtl (Smith *et al.*, 2009). En el caso en el que la misma región se asoció al mismo carácter en distintas campañas se consideró que se trataba del mismo QTL cuando se superpusieron los intervalos de confianza, si coincidieron los signos de sus valores aditivos.

Se evaluaron los marcadores con segregación mendeliana que no pudieron ser incorporados a ningún grupo de ligamiento a través de una regresión lineal simple, declarándose QTLs a las asociaciones con un $p \leq 0,05$. Este análisis también nos permitió estimar la contribución relativa del QTL a la variación fenotípica observada (R^2).

La consistencia de las asociaciones en distintos ambientes y con distintas generaciones fue evaluada con el fin de validar los QTLs.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación fenotípica

8.1.1 Evaluación de los progenitores DDR14 y Explorer y de la generación F₁

Las variedades DDR14 y Explorer, utilizadas para generar la población de mapeo, fueron sembradas en los años 2013, 2014 y 2015. La generación F₁ fue sembrada durante las campañas 2014 y 2015.

El ANDEVA a dos criterios de clasificación realizado entre ambos progenitores, en el cual se consideraron cada uno de los años de evaluación como un ambiente diferente, demostró que la IGA fue significativa para los caracteres DF, NV, NS y LV. Para los casos en los que la interacción no resultó significativa se determinó que el efecto del ambiente resultó significativo para las variables AP, SV y PS, mientras que el efecto del genotipo fue significativo para SV y PS.

	GL	DF		AP		NV	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	1	6,25	5 ^{NS}	149,11	3,51 ^{NS}	208,33	6,73*
Ambiente	2	25,8	20,64**	967,38	26,91**	110,18	3,56 ^{NS}
IGA	2	34,7	27,76**	167,93	4,82 ^{NS}	242,93	7,85*
Error	6	1,25		49,15		30,97	
	GL	NS		LV		AV	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	1	13379,37	37,36***	2,78	150,41***	0,02	4,44 ^{NS}
Ambiente	2	2831,46	7,91*	0,3	16,31**	0,01	1,71 ^{NS}
IGA	2	2548,32	7,12*	0,15	8,29*	0,01	1,13 ^{NS}
Error	6	358,16		0,02		0,0047	
	GL	SV		DS		PS	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	1	5,41	84,77***	0,003	2,88 ^{NS}	0,0018	6,37*
Ambiente	2	0,5	7,9*	0,0034	3,21 ^{NS}	0,0024	8,56*
IGA	2	0,07	1,17 ^{NS}	0,00086	0,82 ^{NS}	0,0012	4,16 ^{NS}
Error	6	0,06		0,001		0,00028	

Tabla 8. Análisis de la Variancia a dos criterios de clasificación para los distintos caracteres cuantitativos evaluados en los parentales DDR14 y Explorer en el año 2013, 2014 y 2015. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g). GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios. F: Prueba F de Snedecor. NS: Diferencias no significativas; *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad, $p < 0,05$, **: Diferencias significativas al 1 % de probabilidad, $p < 0,01$; ***: Diferencias significativas al 0,1 % de probabilidad, $p < 0,001$.

En la Tabla 9 se muestran los valores medios observados en cada uno de los ambientes evaluados para los parentales. Al comparar estos valores encontramos que, excepto para AP, para todos los caracteres se han obtenido diferencias significativas entre los parentales en al menos un ambiente. Siempre que hubo diferencias DDR14 resultó superior a Explorer, dado que presentó mayor NV, NS, LV, AV, DS y SV y menor DF.

	2013		2014		2015	
	DDR14	Explorer	DDR14	Explorer	DDR14	Explorer
DF	91,00±1,00a	87,00±1,00a	83,00±1,00a	92,00±1,00b	83,50±0,50a	83,50±0,50a
AP	58,33±1,25a	53,33±2,75a	77,9±1,50a	80,70±0,30a	76,30±4,08a	97,90±9,20a
NV	43,00±2,25a	18,70±3,5b	28,00±1,80a	33,30±4,90a	39,25±0,75a	38,40±8,30a
NS	151,00±18,75a	34,00±3,00b	91,20±1,60a	68,60±17,40a	152,15±0,70a	105,65±24,55a
LV	7,19±0,11a	5,75±0,02b	6,19±0,13a	5,61±0,12a	6,79±0,10a	5,84±0,04b
AV	1,12±0,02a	0,96±0,03b	0,96±0,06a	0,94±0,08a	1,06±0,03a	1,00±0,05a
SV	3,51±0,25a	1,82±0,21b	3,30±0,13a	2,02±0,23b	3,88±0,09a	2,74±0,05b
DS	0,45±0,04a	0,44±0,04a	0,50±0,01a	0,44±0,02a	0,50±0,00a	0,48±0,00b
PS	0,17±0,01a	0,12±0,01b	0,16±0,01a	0,12±0,01b	0,18±0,01a	0,19±0,02a

Tabla 9. Valores promedios y errores estándar observados para DDR14 y Explorer en cada uno de los años evaluados. Letras distintas junto a las medias indican diferencias significativas ($p<0,05$) de acuerdo a la prueba de comparación de valores promedio (T). DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).

La comparación de los valores promedio de la F_1 respecto al padre de valor superior, permitió determinar la presencia de heterosis para los caracteres NV (62 y 197 %) y NS (88 y 196 %) en ambos ambientes. En menor medida se observó heterosis para el carácter DS en el año 2015 (13 %).

Variable	2014			2015		
	Mejor padre	F_1	% Heterosis	Mejor padre	F_1	% Heterosis
DF	83,00±1,00a	82,00±0,00a	-1,20	83,50±0,50a	83,00±2,00a	-0,60
AP	77,90±1,50a	77,00±4,00a	-1,16	76,30±4,08a	98,68±6,93a	29,33
NV	33,30±4,90a	54,03±1,64b	62,26	39,25±0,75a	116,58±11,18b	197,01
NS	91,20±1,60a	171,50±0,50b	88,05	152,15±0,70a	450,50±22,65b	196,09
LV	6,19±0,13a	6,28±0,28a	1,42	6,79±0,10a	6,92±0,04a	1,95
AV	0,96±0,06a	0,97±0,01a	1,38	1,06±0,03a	0,96±0,03a	-9,43
SV	3,30±0,13a	3,17±0,16a	-3,82	3,88±0,09a	3,82±0,35a	-1,64
DS	0,50±0,01a	0,48±0,01a	-4,88	0,50±0,00a	0,57±0,10a	13,09
PS	0,16±0,01a	0,16±0,00a	-1,15	0,19±0,02a	0,18±0,00a	-6,83

Tabla 10. Valores promedios y errores estándar de la población F_1 generada a partir del cruzamiento entre DDR14 y Explorer. Letras distintas junto a las medias indican diferencias significativas ($p<0,05$) de acuerdo a la prueba de comparación de valores promedio (T). Se muestran los porcentajes de heterosis con respecto al padre de mejor valor. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).

8.1.2 Evaluación de la población F_2 y de las familias $F_{2:3}$

Las poblaciones segregantes (Figura 6) fueron evaluadas durante tres períodos productivos. Todos los caracteres presentaron una distribución normal, con valores del estadístico $W > 0,85$.



Figura 6. Poblaciones segregantes sembradas en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias. F_2 (2012), $F_{2:3}$ (2014 y 2015), respectivamente.

8.1.2.1 Evaluación de la interacción genotipo por ambiente en las familias $F_{2:3}$

Como se observa en la Tabla 11, el ANDEVA mostró que la IGA fue altamente significativa para todos los caracteres, excepto para LV, variable para la cual sólo se observaron diferencias entre las familias y entre los años evaluados.

	GL	DF		AP		NV	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	42,22	4,14***	164,58	1,99***	674,08	3,62***
Ambiente	1	179,23	17,56***	22402,51	270,99***	19495,51	104,56***
IGA	109	17,11	1,68***	155,77	1,88***	558,54	3,00***
Error	220	10,21		82,67		186,45	
	GL	NS		LV		AV	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	6629,95	3,34***	0,38	3,53***	0,01	3,26***
Ambiente	1	508267,6	255,94***	3,66	33,93***	0,17	49,12***
IGA	109	5701,23	2,87***	0,1	0,93 ^{NS}	0,01	1,56**
Error	220	1985,88		0,11		0,0034	
	GL	SV		DS		PS	
		CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	0,27	2,72***	0,0037	2,36***	0,00086	1,57**
Ambiente	1	34,41	341,27***	0,38	246,12***	0,03	49,89***
IGA	109	0,29	2,85***	0,0033	2,11***	0,00088	1,61**
Error	220	0,1		0,0016		0,00055	

Tabla 11. Análisis de la Variancia a dos criterios de clasificación para los distintos caracteres cuantitativos evaluados en la población $F_{2:3}$ en el 2014 y 2015. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g). F: Prueba F de Snedecor. NS: Diferencias no significativas, **: Diferencias significativas al 1 % de probabilidad, $p < 0,01$; ***: Diferencias significativas al 0,1 % de probabilidad, $p < 0,001$.

8.1.2.2 Análisis por ambiente de los individuos F_2 y las familias $F_{2:3}$

En la Tabla 12 se muestran los valores promedios, mínimos y máximos y el coeficiente de variación para los caracteres evaluados en cada ambiente. La variabilidad de los caracteres se midió a través del Coeficiente de variación (CV), considerándose baja si fue menor al 10 %, intermedia cuanto tomó valores entre 10 y 20 % y alta si resultó mayor al 20 % (Kosev *et al.*, 2012). Los CV fluctuaron de distinta manera en función al carácter y a la generación evaluada. Los caracteres NV y NS presentaron valores altos de CV en todas las poblaciones, mientras que DF presentó valores bajos. LV, AV y DS presentaron valores de CV intermedios en la población F_2 y bajos en las poblaciones $F_{2:3}$. El resto de las variables evaluadas presentaron valores intermedios en todos los casos. Para todos los caracteres se observó una mayor variabilidad en la generación F_2 .

Variable	F_2 (2013)				$F_{2:3}$ (2014)				$F_{2:3}$ (2015)			
	Media	CV	Mín	Máx	Media	CV	Mín	Máx	Media	CV	Mín	Máx
DF	90,22	7,71	78,00	117,00	85,83	5,73	69,00	96,00	84,63	3,38	72,00	90,50
AP	55,18	19,28	29,00	78,00	78,83	11,32	56,10	98,70	93,62	10,53	68,17	128,78
NV	24,59	52,6	8,89	66,00	44,38	33,23	17,60	109,67	57,78	38,62	27,99	146,67
NS	65,06	58,73	22,00	179,00	125,93	34,8	47,50	251,33	194,23	37,51	93,12	482,67
LV	6,49	12,83	3,50	8,38	6,05	6,44	5,01	7,10	6,24	5,50	5,31	7,39
AV	1,05	11,82	0,69	1,56	0,98	8,08	0,72	1,19	1,02	5,16	0,89	1,17
SV	2,64	20,91	1,10	3,95	2,83	12,46	1,64	3,85	3,4	11,57	2,53	4,54
DS	0,50	12,27	0,36	0,78	0,51	5,10	0,42	0,57	0,56	9,65	0,45	0,73
PS	0,18	21,15	0,08	0,25	0,17	13,23	0,10	0,24	0,18	10,11	0,14	0,23

Tabla 12. Valores promedios, mínimos y máximos y coeficiente de variación para los caracteres evaluados en la población F_2 y las familias $F_{2:3}$ en los dos ambientes. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).

El ANDEVA realizado en cada uno de los años de evaluación mostró diferencias altamente significativas entre las familias $F_{2:3}$ para todos los caracteres cuantitativos evaluados (Tabla 13).

Año 2014		DF		AP		NV	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	42,02	2,66***	136,24	2,16***	357,14	2,21***
	110	15,81		63,16		161,4	
		NS		LV		AV	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	2852,39	2,05***	0,26	2,48***	0,01	2,81***
	110	1390,18		0,11		0,0038	
		SV		DS		PS	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	0,26	2,74***	0,0013	3,37***	0,00084	1,69**
	110	0,1		0,00037		0,0005	

Año 2015		DF		AP		NV	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	16,11	3,24***	191,65	1,91***	963,8	4,62***
	110	4,97		100,09		208,72	
		NS		LV		AV	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	9920,57	3,94***	0,23	2,13***	0,01	1,84***
	110	2515,39		0,11		0,003	
		SV		DS		PS	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	109	0,31	2,89***	0,01	2,25***	0,00066	1,78**
	110	0,11		0,0026		0,00037	

Tabla 13. Análisis de la Variancia a un criterio de clasificación para los distintos caracteres cuantitativos evaluados en la población F_2 en el año 2013 y en la población $F_{2:3}$ en el 2014 y 2015. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g). GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios. F: Prueba F de Snedecor. **: Diferencias significativas al 1 % de probabilidad, $p < 0,01$; ***: Diferencias significativas al 0,1 % de probabilidad, $p < 0,001$.

Los valores de heredabilidad en sentido estricto (h^2) calculados con las variancias estimadas a partir del ANDEVA, así como los errores estándar correspondientes, se presentan en la Tabla 14. De acuerdo con Singh (2005), los caracteres se consideran de heredabilidad alta cuando ésta es mayor a 0,50, de heredabilidad media entre 0,20 y 0,50, y de heredabilidad baja si es menor a 0,20. Todos los caracteres evaluados presentaron heredabilidad alta en ambos ambientes, con excepción de PS, que presentó valores intermedios.

Variable	h ² 2014	h ² 2015
DF	0,680±0,076	0,793±0,069
AP	0,550±0,083	0,471±0,086
NV	0,566±0,082	0,966±0,056
NS	0,517±0,084	0,893±0,062
LV	0,608±0,080	0,529±0,084
AV	0,674±0,076	0,808±0,068
SV	0,667±0,077	0,714±0,074
DS	0,835±0,066	0,881±0,063
PS	0,381±0,089	0,422±0,088

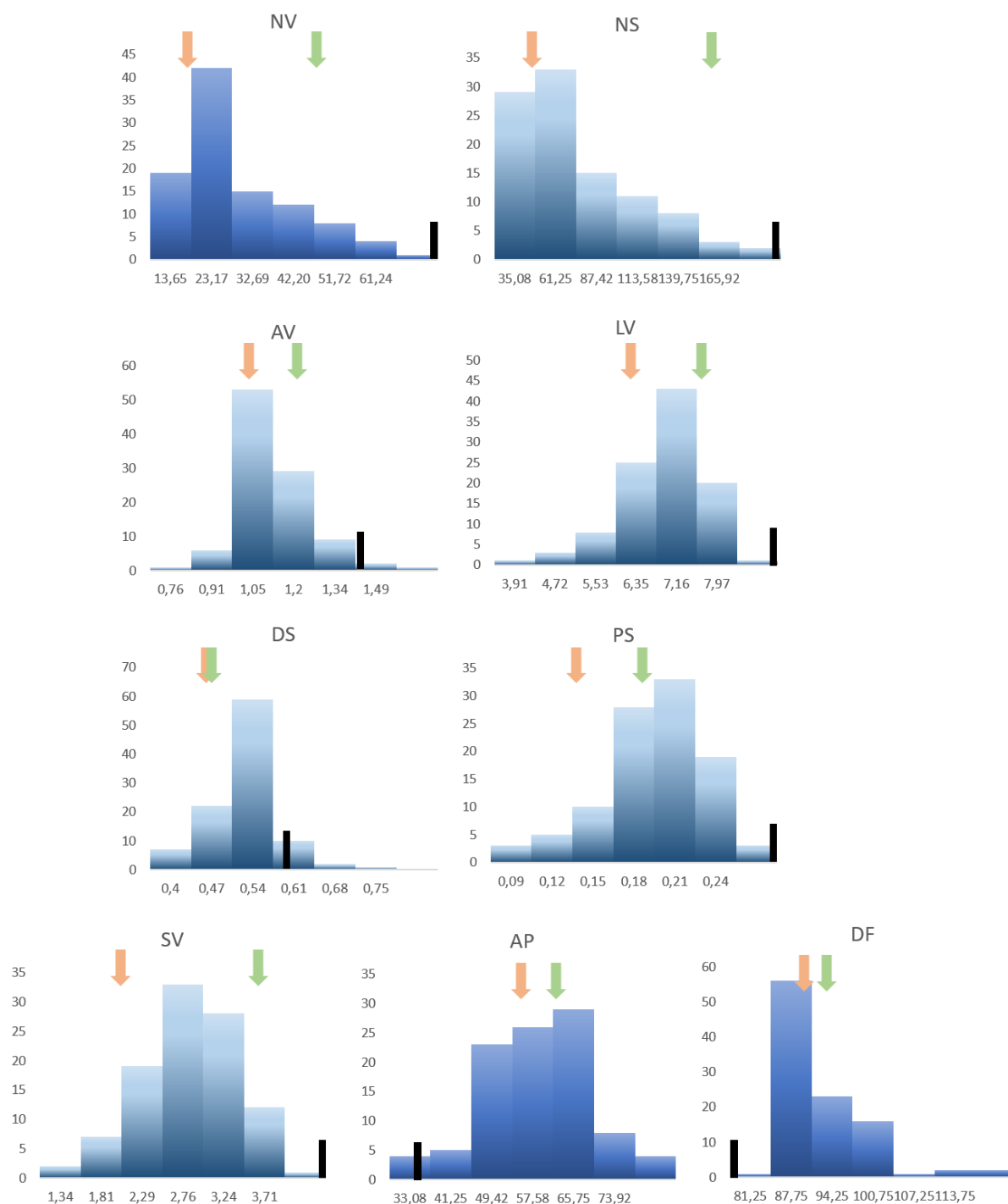
Tabla 14. Heredabilidad en sentido estricto con el error estándar correspondiente para los caracteres cuantitativos evaluados en la población F_{2:3} en el 2014 y 2015. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).

Se detectó la presencia de segregantes transgresivos en los distintos ambientes evaluados, demostrando la generación de nueva variabilidad en la población. En la Tabla 15 se muestran los valores medios del padre de mejor comportamiento en cada ambiente y el desvío estándar obtenido en las poblaciones segregantes, que se utilizaron para calcular el valor límite a partir del cual un individuo F₂ o una familia F_{2:3} fue considerada como transgresiva. Solo se muestran los casos que resultan útiles desde el punto de vista del mejoramiento, es decir los transgresivos de mayor NV, NS, LV, AV, DS, SV y PS y de menor AP y DF. En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran las distribuciones de frecuencia de los caracteres evaluados y se indican los valores de los progenitores. Se pueden visualizar los valores del padre superior y de aquellos individuos que lo superan. En la población F₂ se observaron menos de un 5 % de individuos transgresivos para los caracteres AP, AV y DS. El promedio de los individuos transgresivos para AP resultó 22,83 cm menor al del padre de menor altura, mientras que las vainas resultaron 0,33 cm más anchas y las semillas con un diámetro mayor por 0,21 cm. En las familias F_{2:3} evaluadas en el año 2014 se observaron segregantes transgresivos para todos los caracteres, con excepción de SV, mientras que en el 2015 se observaron familias segregantes transgresivos para los caracteres DF, NV, NS, AV y DS. En ambos ambientes se observaron más de 10 % de familias transgresivas para los caracteres NV y NS, el promedio de estas familias superó al mejor padre por 41 vainas y 127 semillas por planta en el año 2014 y por 62 vainas y 201 semillas por planta en el año 2015. Es importante resaltar las familias F_{2:3} que resultaron transgresivas para algún carácter en los dos ambientes evaluados. Para NV ocho familias (5, 48, 59, 62, 84, 91, 118, 128) presentaron

segregación transgresiva en ambos ambientes mientras que cuatro de ellas (5, 48, 62, 91) también lo hicieron para NS. Las familias 50 y 8 presentaron segregaciones transgresivas para DS en ambos ambientes.

2013					
<i>Variable</i>	<i>Mejor padre</i>	<i>2 DE F_2</i>	<i>Valor límite</i>	<i>% Segregantes transgresivos</i>	<i>Promedio de individuos transgresivos</i>
<i>DF</i>	87,00	13,90	73,10	-	-
<i>AP</i>	53,33	21,02	32,31	1,82	30,50
<i>NV</i>	43,00	25,80	68,80	-	-
<i>NS</i>	151,00	74,96	225,96	-	-
<i>LV</i>	7,19	1,66	8,85	-	-
<i>AV</i>	1,12	0,24	1,36	2,73	1,45
<i>SV</i>	3,51	1,08	4,59	-	-
<i>DS</i>	0,45	0,12	0,57	4,55	0,66
<i>PS</i>	0,17	0,08	0,25	-	-
2014					
<i>Variable</i>	<i>Mejor padre</i>	<i>2 DE $F_{2:3}$</i>	<i>Valor límite</i>	<i>% Segregantes transgresivos</i>	<i>Promedio de familias transgresivas</i>
<i>DF</i>	83,00	9,84	73,16	2,73	71,00
<i>AP</i>	77,90	17,84	60,06	2,73	57,50
<i>NV</i>	33,30	29,50	62,80	10,91	74,58
<i>NS</i>	91,20	87,64	178,84	11,82	218,58
<i>LV</i>	6,19	0,78	6,97	0,91	7,10
<i>AV</i>	0,96	0,16	1,12	1,82	1,17
<i>SV</i>	3,30	0,90	4,20	-	-
<i>DS</i>	0,50	0,06	0,56	2,73	0,57
<i>PS</i>	0,16	0,04	0,20	7,27	0,22
2015					
<i>Variable</i>	<i>Mejor padre</i>	<i>2 DE $F_{2:3}$</i>	<i>Valor límite</i>	<i>% Segregantes transgresivos</i>	<i>Promedio de familias transgresivas</i>
<i>DF</i>	83,50	5,72	77,78	0,91	72,00
<i>AP</i>	76,30	19,72	56,58	-	-
<i>NV</i>	39,25	44,64	83,89	14,54	103,82
<i>NS</i>	152,15	145,72	297,87	11,82	353,63
<i>LV</i>	6,79	0,68	7,47	-	-
<i>AV</i>	1,06	0,10	1,16	0,91	1,17
<i>SV</i>	3,88	0,78	4,66	-	-
<i>DS</i>	0,50	0,10	0,60	25,45	0,64
<i>PS</i>	0,19	0,04	0,23	-	-

Tabla 15. Porcentaje de segregantes transgresivos para los caracteres cuantitativos evaluados. 2DE: doble del desvío estándar de la población segregante, DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).



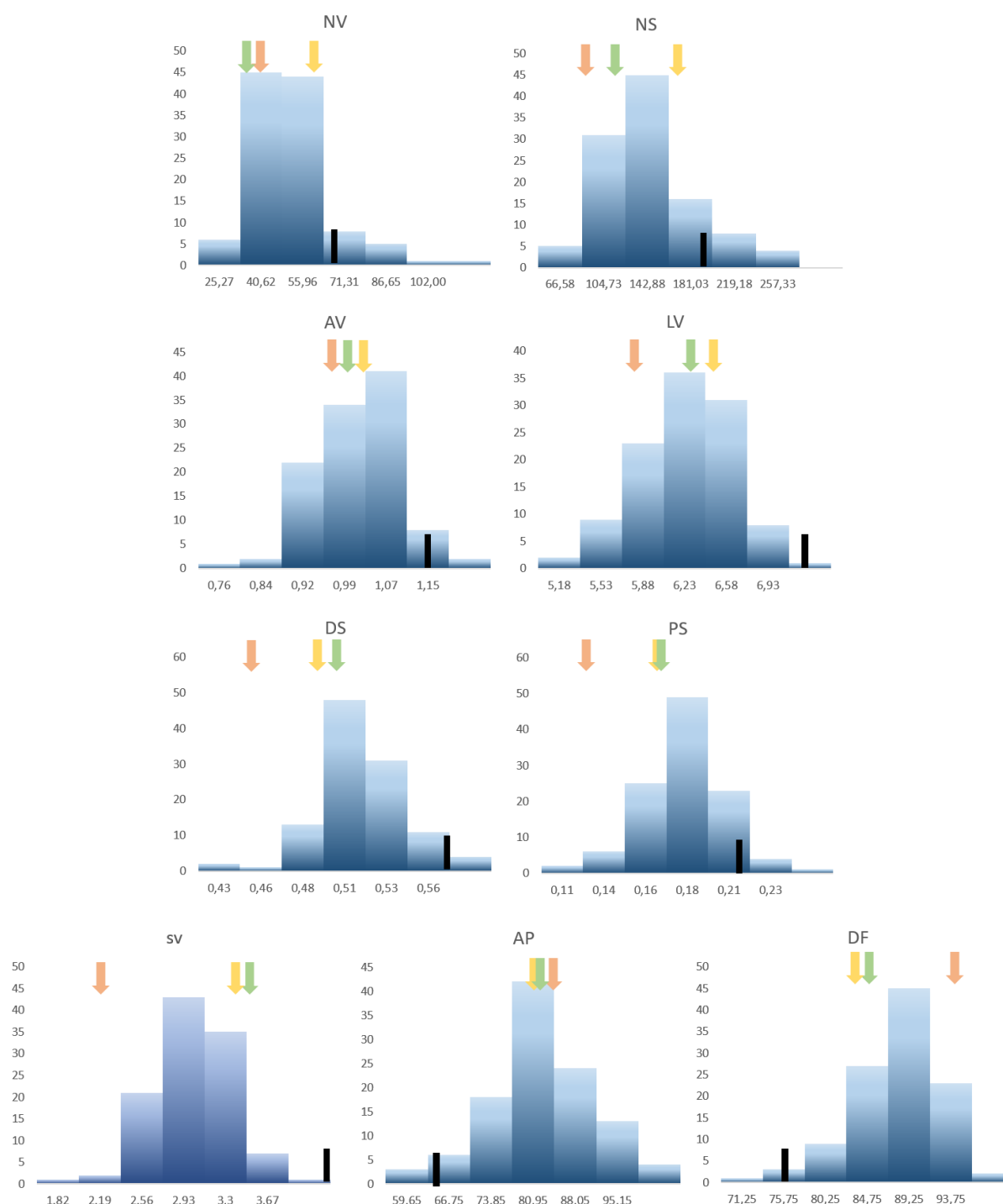


Figura 8. Distribuciones de frecuencias de los caracteres evaluados durante el año 2014 en la población $F_{2,3}$. NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, AV: ancho de la vaina (cm), LV: longitud de la vaina (cm), DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g), SV: número de semillas por vaina, AP: altura de planta (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela. Se indica con una flecha verde el valor medio del parental DDR14 y con una flecha naranja el correspondiente a Explorer y con una flecha amarilla el de la población F_1 . La línea negra indica el valor límite a partir del cual las familias se consideran transgresivas.

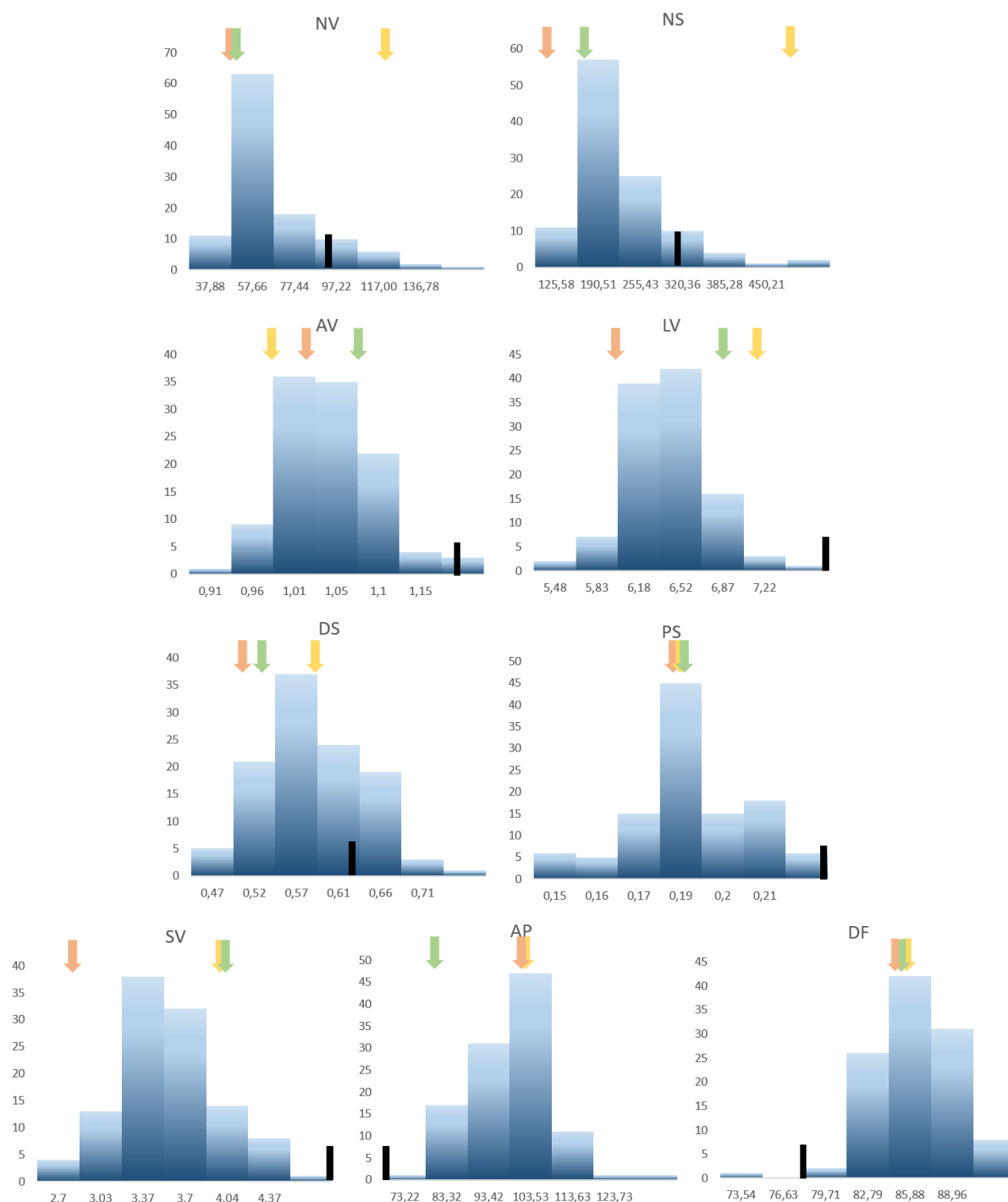


Figura 9. Distribuciones de frecuencias de los caracteres evaluados durante el año 2015 en la población $F_{2:3}$. NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, AV: ancho de la vaina (cm), LV: longitud de la vaina (cm), DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g), SV: número de semillas por vaina, AP: altura de planta (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela. Se indica con una flecha verde el valor medio del parental DDR14 y con una flecha naranja el correspondiente a Explorer y con una flecha amarilla el de la población F_1 . La línea negra indica el valor límite a partir del cual las familias se consideran transgresivos.

8.1.2.3 Influencia de las condiciones ambientales en el comportamiento de las familias F_{2:3}

Para determinar la influencia de las condiciones ambientales sobre la manifestación de los diferentes caracteres, se compararon los valores promedios obtenidos para cada familia F_{2:3} en los distintos años evaluados (Tabla 29 de la sección Anexos), observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en el comportamiento de algunas familias a través de los años para todos los caracteres evaluados. Como se observa en la Tabla 16, las mayores diferencias entre los años se observaron para los caracteres SV, NS, AP y NV. En general, la mayoría de las familias mostraron comportamiento superior para todos los caracteres en el año 2015. De acuerdo a los datos tomados de la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R., en dicho año se registraron menores temperaturas y mayores precipitaciones totales en el período entre la siembra y cosecha del cultivo (Tabla 17) y menores temperaturas medias durante la etapa de llenado de granos (Tabla 18). Además, en el 2014 se detectaron temperaturas que alcanzaron los 28 °C a partir de la última semana de octubre.

<i>Variable</i>	<i>DF</i>	<i>AP</i>	<i>NV</i>	<i>NS</i>	<i>LV</i>	<i>AV</i>	<i>SV</i>	<i>DS</i>	<i>PS</i>
N° de familias con diferencias significativas	10	21	16	22	7	13	28	14	6
% de familias superiores en 2014	30	95,24	6,25	4,55	0	15,38	3,57	0	16,67
% de familias superiores en 2015	70	4,76	93,75	95,45	100	84,62	96,43	100	83,33

Tabla 16. Resultados obtenidos al comparar los promedios obtenidos para cada familia F_{2:3} en los años 2014 y 2015. DF: días a 50 % de floración de la parcela, AP: altura de planta (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g).

	2014	2015
Temperatura promedio (°C)	15,40±1,40	14,63±1,04
Precipitaciones (mm)	350,20	413,10

Tabla 17. Datos meteorológicos de temperaturas promedio registradas durante el período comprendido entre Junio y Noviembre para los años 2014 y 2015 en la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R.

	2014	2015
Temperatura promedio (°C)	18,63±0,58	16,21±0,47
Temperatura máxima (°C)	28,00	23,85
Temperatura mínima (°C)	11,45	8,25

Tabla 18. Datos meteorológicos de temperaturas máxima, mínima y promedio registradas durante el período comprendido entre el 20 de septiembre y el 10 de Noviembre para los años 2014 y 2015 tomados de la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R.

8.1.3 Correlaciones fenotípicas y genéticas entre variables

Se realizó el análisis de las correlaciones entre los caracteres en cada uno de los años evaluados. Para la mayoría de los caracteres las correlaciones genéticas resultaron ser mayores en magnitud

y significancia que las fenotípicas. Analizando los valores de correlación genética observados, se observa que los mismos variaron entre los dos ambientes tanto en magnitud como en signo. Durante el año 2014 (Tabla 19), NV presentó correlación positiva significativa con NS (0,906) y en menor medida con DS y PS (0,448 y 0,488, respectivamente); NS también se asoció positivamente con DS y PS (0,427 y 0,412, respectivamente); por otro lado se encontró correlación positiva entre LV y AV (0,492) y entre PS y DS (0,873). AP se correlacionó negativamente con SV (-0,548). Por último, DF mostró correlación negativa con LV y AV (-0,428 y -0,699, respectivamente). Durante el año 2015 (Tabla 20), NV también presentó correlación positiva significativa con NS (0,956) y ambas variables correlacionaron con DS (0,537 y 0,489); por otro lado, DF mostró correlación negativa con AP, LV y PS (-0,447, -0,542 y -0,775 respectivamente). AP correlacionó negativamente con SV (-0,505) y positivamente con PS (0,486). Por último, PS mostró correlación positiva con LV y AV (0,563 y 0,667, respectivamente) y negativa con SV (-0,431).

		AP	NV	NS	LV	AV	SV	DS	PS
DF	CF	-0,046	0,024	0,128	-0,378*	-0,547***	0,230*	0,204*	0,105
	CG	-0,038	0,165*	0,326***	-0,428***	-0,699***	0,323***	0,269**	0,165*
AP	CF		0,316***	0,163	-0,109	-0,007	-0,379***	0,168*	0,126
	CG		0,380**	0,144	-0,171*	-0,127	-0,548***	0,235**	0,318***
NV	CF			0,907***	0,002	0,031	-0,098	0,255**	0,211*
	CG			0,906***	-0,025	-0,042	-0,129	0,448***	0,488***
NS	CF				-0,039	0,011	0,299**	0,229*	0,165
	CG				-0,107	-0,087	0,296**	0,427***	0,412***
LV	CF					0,475***	-0,072	-0,223*	-0,202*
	CG					0,492***	-0,087	-0,326***	-0,338***
AV	CF						-0,012	-0,136	-0,169*
	CG						-0,031	-0,208*	-0,359***
SV	CF							-0,02	-0,057
	CG							-0,042	-0,190*
DS	CF								0,729***
	CG								0,873***

Tabla 19. Correlaciones genéticas y fenotípicas observadas durante el año 2014 entre las variables estudiadas. CF: correlación fenotípica, CG: correlación genética. AP: altura de planta (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g). *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad, $p < 0,05$, **: Diferencias significativas al 1 % de probabilidad, $p < 0,01$, ***: Diferencias significativas al 0,1 % de probabilidad, $p < 0,001$.

		AP	NV	NS	LV	AV	SV	DS	PS
DF	CF	-0,346***	-0,16	-0,138	-0,300**	-0,136	0,066	-0,15	-0,438
	CG	-0,447***	-0,189*	-0,146	-0,542***	-0,263***	0,156	-0,252***	-0,775***
AP	CF		0,03	-0,041	0,065	0,037	-0,283**	0,147	0,146
	CG		-0,03	-0,152	0,178*	0,167*	-0,505***	0,321***	0,486***
NV	CF			0,944***	-0,088	0,206*	-0,285**	0,387***	0,176*
	CG			0,956***	-0,116	0,336***	-0,371***	0,537***	0,249**
NS	CF				-0,042	0,195*	0,024	0,345***	0,096
	CG				-0,042	0,327***	-0,096	0,489***	0,128
LV	CF					0,402***	0,165	0,037	0,282**
	CG					0,308***	0,363***	0,082	0,563***
AV	CF						-0,062	0,206*	0,272**
	CG						-0,087	0,415***	0,667***
SV	CF							-0,135	-0,233**
	CG							-0,238**	-0,431***
DS	CF								0,198*
	CG								0,357***

Tabla 20. Correlaciones genéticas y fenotípicas observadas durante el año 2015 entre las variables estudiadas. CF: correlación fenotípica, CG: correlación genética. AP: altura de planta (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela, LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, SV: número de semillas por vaina, DS: diámetro de semilla (cm), PS: peso de semilla (g). *: Diferencias significativas al 5 % de probabilidad, $p < 0,05$, **: Diferencias significativas al 1 % de probabilidad, $p < 0,01$; ***: Diferencias significativas al 0,1 % de probabilidad, $p < 0,001$.

8.2 Evaluación molecular

8.2.1 Extracción del ADN

A partir de hojas jóvenes de ambos progenitores y de los 110 individuos de la progenie (F_2) se realizó la extracción del ADN siguiendo el protocolo de (Doyle y Doyle, 1990) y se cuantificó el ADN obtenido por comparación con ADN estándar (100 ng/ μ l) en geles de agarosa (1 %) (Figura 10). La población de mapeo y los parentales fueron sometidos a análisis molecular mediante marcadores SRAP (Figura 11), SSR (Figura 12) y SNP.

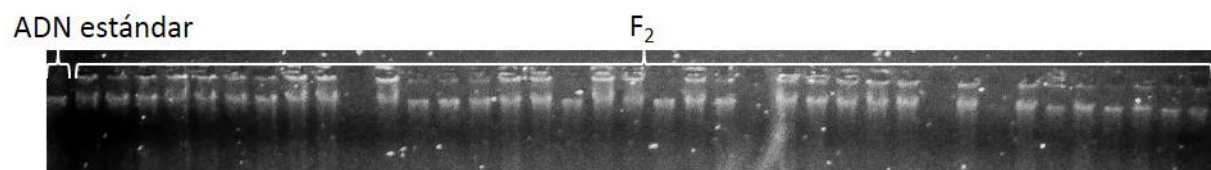


Figura 10. Gel de agarosa 1 %. Se observan extracciones de ADN genómico de los individuos de la población y el ADN estándar utilizado para cuantificar la cantidad de ADN (100ng/ μ l).

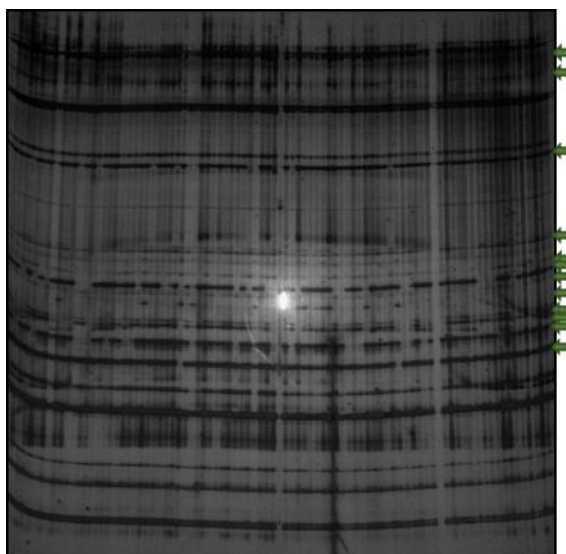


Figura 11. Fragmento de gel de poliacridamida al 6 %. Se observan los resultados del análisis SRAP con la combinación Me7-Em8 en la población de mapeo. Se indican con flechas las bandas polimórficas.

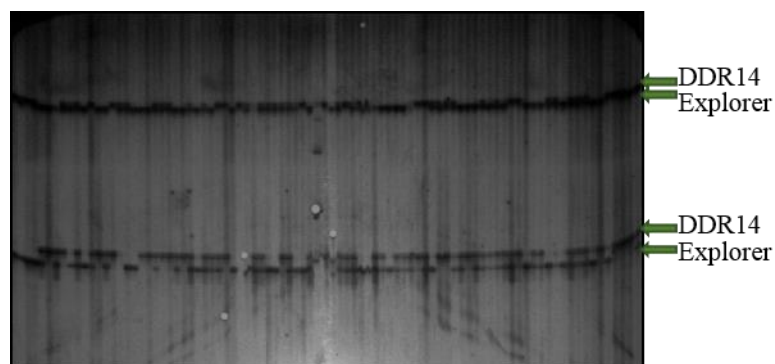


Figura 12. Fragmento de gel de poliacridamida al 6 %. Se observan los resultados del análisis con los microsatélites AA205 Y AA278 en la población de mapeo. Se indican con una flecha los alelos correspondientes a los parentales.

8.2.2 Marcadores SRAP

Se evaluó cada combinación de cebadores SRAP para identificar bandas polimórficas entre los parentales. Del total de 50 combinaciones probadas, 41 fueron utilizadas para los análisis posteriores, ya que presentaron, al menos, una banda polimórfica entre ambos progenitores y segregación en la población F₂.

Se analizaron un total de 948 marcadores/bandas en la generación F₂ (PM estimado entre 110 y 1200 pb), de las cuales 491 (51,8 %) resultaron polimórficas (BP), con un promedio de 6,5 BP

por combinación de cebadores. La combinación de cebadores que presentó mayor polimorfismo fue Me5-Em4, con la que se obtuvieron 51 bandas polimórficas (Tabla 21).

<i>Combinación</i>	<i>Bandas totales</i>	<i>Bandas polimórficas</i>	<i>Combinación</i>	<i>Bandas totales</i>	<i>Bandas polimórficas</i>
<i>Me1-Em1</i>	0	0	<i>Me6-Em6</i>	7	3
<i>Me1-Em2</i>	30	9	<i>Me6-Em7</i>	15	6
<i>Me1-Em3</i>	31	12	<i>Me6-Em8</i>	27	8
<i>Me1-Em4</i>	26	22	<i>Me6-Em9</i>	16	8
<i>Me1-Em5</i>	22	15	<i>Me6-Em10</i>	0	0
<i>Me2-Em1</i>	45	32	<i>Me7-Em6</i>	18	10
<i>Me2-Em2</i>	28	8	<i>Me7-Em7</i>	14	6
<i>Me2-Em3</i>	26	8	<i>Me7-Em8</i>	26	12
<i>Me2-Em4</i>	25	13	<i>Me7-Em9</i>	19	14
<i>Me2-Em5</i>	23	17	<i>Me7-Em10</i>	0	0
<i>Me3-Em1</i>	6	4	<i>Me8-Em6</i>	35	16
<i>Me3-Em2</i>	34	13	<i>Me8-Em7</i>	35	9
<i>Me3-Em3</i>	19	11	<i>Me8-Em8</i>	16	8
<i>Me3-Em4</i>	26	7	<i>Me8-Em9</i>	16	8
<i>Me3-Em5</i>	21	14	<i>Me8-Em10</i>	0	0
<i>Me4-Em1</i>	0	0	<i>Me9-Em6</i>	22	4
<i>Me4-Em2</i>	33	12	<i>Me9-Em7</i>	9	3
<i>Me4-Em3</i>	15	12	<i>Me9-Em8</i>	13	2
<i>Me4-Em4</i>	27	10	<i>Me9-Em9</i>	0	0
<i>Me4-Em5</i>	10	4	<i>Me9-Em10</i>	0	0
<i>Me5-Em1</i>	0	0	<i>Me10-Em6</i>	13	16
<i>Me5-Em2</i>	45	33	<i>Me10-Em7</i>	15	6
<i>Me5-Em3</i>	14	4	<i>Me10-Em8</i>	11	6
<i>Me5-Em4</i>	62	51	<i>Me10-Em9</i>	9	4
<i>Me5-Em5</i>	33	24	<i>Me10-Em10</i>	11	7

Tabla 21. Número de bandas y bandas polimórficas generadas a partir de los marcadores SRAP. La combinación que presentó el mayor número de bandas polimórficas se encuentra resaltada con color violeta.

8.2.3 Marcadores SSR

Al evaluar los 49 SSR en ambos progenitores se obtuvieron productos amplificados sólo con 16 de ellos, de los cuales 12 resultaron polimórficos y cuatro monomórficos. En aquellos casos en los que no se observó amplificación con el protocolo original, se modificaron distintos parámetros de la reacción de PCR, como las concentraciones de ADN y Cl_2Mg . Cuando se aumentó la concentración de Cl_2Mg a 2 mM se logró la amplificación de 12 marcadores que no mostraron polimorfismos en la población evaluada. Para los 21 marcadores restantes se aumentó la concentración de ADN a 30 ng y posteriormente la concentración de Cl_2Mg a 2,5 mM pero no se logró la amplificación (Tabla 22). Los marcadores polimórficos fueron evaluados en la población de mapeo.

Nombre	Grupo de ligamiento	Resultado	Nombre	Grupo de ligamiento	Resultado
AA160	7	Polimórfica	AD159	5, 6, 7	Monomórfica
AA200	6	Polimórfica	AD171	5	Monomórfica
AA205	2	Polimórfica	AD51	6	Monomórfica
AA278	3	Polimórfica	AA233	2	No amplifico
AA355	3	Polimórfica	AA285	4	No amplifico
AB23	5	Polimórfica	AA37	1	No amplifico
AC58	5	Polimórfica	AA460	5	No amplifico
AD147	1	Polimórfica	AA475	5	No amplifico
AD56	7	Polimórfica	AA504	2	No amplifico
AD59	6	Polimórfica	AB 133	7	No amplifico
AD61	4	Polimórfica	AB149	2	No amplifico
D21	1	Polimórfica	AB28	1	No amplifico
A9	5	Monomórfica	AB36	7	No amplifico
AA135	7	Monomórfica	AC74	6	No amplifico
AA163.2	5	Monomórfica	AC75	1	No amplifico
AA18	2	Monomórfica	AD174	3	No amplifico
AA189	2	Monomórfica	AD186	2, 4, 6	No amplifico
AA335	6	Monomórfica	AD237	7	No amplifico
AA399	5	Monomórfica	AD70	1	No amplifico
AA491	3	Monomórfica	AA103	6	No amplifico
AA5	3	Monomórfica	AA121	1	No amplifico
AA92	5	Monomórfica	AA153	2	No amplifico
AB25	3	Monomórfica	AB53	3	No amplifico
AD146	7	Monomórfica	AC76a	6	No amplifico
AD148	2	Monomórfica			

Tabla 22. Resultados obtenidos en la población en estudio con los microsatélites evaluados.

8.2.4 Marcadores SNP identificados por la técnica GBS

Se aplicó la técnica GBS sobre 94 individuos de la población F_2 y los progenitores para detectar marcadores SNP. Como producto de la secuenciación de las muestras se obtuvieron las librerías génicas correspondientes a los individuos de la población F_2 de entre 137.260 y 28.959.820 lecturas, con 33.781.664 lecturas para DDR14 y 36.296.798 para Explorer. La calidad de las lecturas se midió a través del parámetro %Q>30 que indica el porcentaje de lecturas para las cuales el error es menor al 99,9 %, el cual fue mayor al 80 % en todas las muestras. El % de GC varió entre 40 y 47 %. Luego de asignar a los individuos de acuerdo a los códigos de barra específicos, los mismos fueron removidos y las secuencias fueron procesadas para eliminar errores y duplicaciones. Un 84,19 % de todas las muestras pudieron ser alineadas contra el borrador del genoma de arveja. Utilizando las herramientas del paquete Samtools se realizó la

identificación de los SNPs en los parentales y la población de mapeo, generándose 2.994 marcadores, que presentaron en total un 69,6 % de datos perdidos.

8.2.5 Registro de marcadores moleculares y análisis de segregación

Se procedió a evaluar los datos de los marcadores SSR, SRAP y SNP polimórficos en los 94 individuos de la población que fueron evaluados con la técnica GBS. Se eliminaron los marcadores que presentaron más de 47 (50 %) datos perdidos así como también los individuos sin datos para más de 436 (50 %) marcadores, quedando un total de 872 marcadores (10 SSR, 491 SRAP, 371 SNP) y 87 individuos en la población de mapeo que permitieron avanzar en el análisis.

Estos 872 marcadores polimórficos fueron sometidos a una prueba de χ^2 a fin de determinar si presentaban segregación de tipo mendeliana (Tabla 30 de la sección Anexos). Fueron considerados como marcadores con segregación mendeliana aquellos que presentaron un $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.05}$ y, marcadores con una ligera desviación, aquellos que presentaron valores de $\chi^2_{\alpha=0.05} < \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$, aquellos marcadores que presentaron valores de $\chi^2 \geq \chi^2_{\alpha=0.01}$ fueron considerados como distorsionados.

De esta manera se determinó que los diez marcadores SSR presentaron segregación mendeliana o ligeramente distorsionada, mientras que 261 marcadores SRAP presentaron segregación mendeliana o con una ligera desviación (53,15 %) y 230 (46,85 %) segregación distorsionada. Todos los marcadores SNP presentaron segregación distorsionada.

8.2.6 Construcción del mapa de ligamiento

Inicialmente los 271 marcadores no distorsionados o ligeramente distorsionados se utilizaron para construir los grupos de ligamiento (GL). Como primer paso se establecieron nueve grupos de ligamiento que agruparon 108 marcadores. Los marcadores restantes formaron triplete (15), dobletes (34) o no presentaron ligamiento con ningún otro marcador (114). El paso siguiente fue determinar el orden dentro de cada grupo de ligamiento, para lo cual cada marcador debe estar ligado a otros dos marcadores dentro del grupo. Dado que esto no sucede en todos los casos, se construyó un mapa de ligamiento inicial con 84 marcadores y no se pudo establecer el orden para ninguno de los tripletes. Luego, se realizó una segunda ronda de mapeo considerando a los

marcadores distorsionados sólo si su presencia no alteraba el orden establecido de los marcadores considerados inicialmente. De esta manera se agregaron 35 marcadores distorsionados en los grupos de ligamiento previamente establecidos. Además se incorporaron 15 marcadores con segregación mendeliana que estaban incluidos dentro de los grupos pero que no habían sido mapeados inicialmente. Por último, los grupos de ligamiento fueron asignados en función a los SSR presentes en los mismos, debido a que dichos SSR fueron utilizados en el mapa consenso desarrollado por Loidon *et al.* (2005). Tres grupos de ligamiento no incluyeron marcadores SSR, por lo tanto, no fueron relacionados con grupos de ligamiento del mapa consenso y fueron nombrados como NA (No Alineado).

El mapa final incluyó 134 marcadores distribuidos en 9 GLs, cubriendo una distancia total de 655,495 cM (Figura 13). El GL de mayor tamaño fue el GL 1, con 114,806 cM mapeados y 26 marcadores incluidos; mientras que el GL de menor tamaño fue el GL 7, con 49,117 cM mapeados y 14 marcadores. En promedio se incluyeron 14,88 marcadores por grupo de ligamiento, con una distancia promedio entre marcadores que osciló entre 3,508 para el GL 7 y 8,740 para el GL NA2. En la Tabla 23 se muestra el número de marcadores incluidos en cada GL, su tamaño en cM y la distancia máxima, mínima y promedio entre marcadores. El 56,3 % de los marcadores se encuentran separados por distancias menores a 5 cM, el 94,9 % por menos de 10 cM y el 97,5 % por menos de 15 cM.

GL	Número de marcadores	Marcadores distorsionados	Tamaño (cM)	Distancia máxima entre marcadores (cM)	Distancia mínima entre marcadores (cM)	Distancia promedio entre marcadores (cM)
1	26	10	114,806	14,580	0,221	4,416
2	14	1	71,550	10,462	0,296	5,111
3	9	2	52,859	14,087	0,085	5,873
4	12	6	60,152	15,272	0,034	5,013
5	12	1	49,802	13,558	0,048	4,150
7	14	0	49,117	7,915	0,853	3,508
NA1	24	7	108,635	20,964	0,362	4,526
NA2	9	2	78,661	32,107	2,873	8,740
NA3	14	6	69,913	20,223	0,638	4,994

Tabla 23. Características de los grupos de ligamiento generados en *Pisum sativum* L. utilizando marcadores SRAP, SNP y SSR.

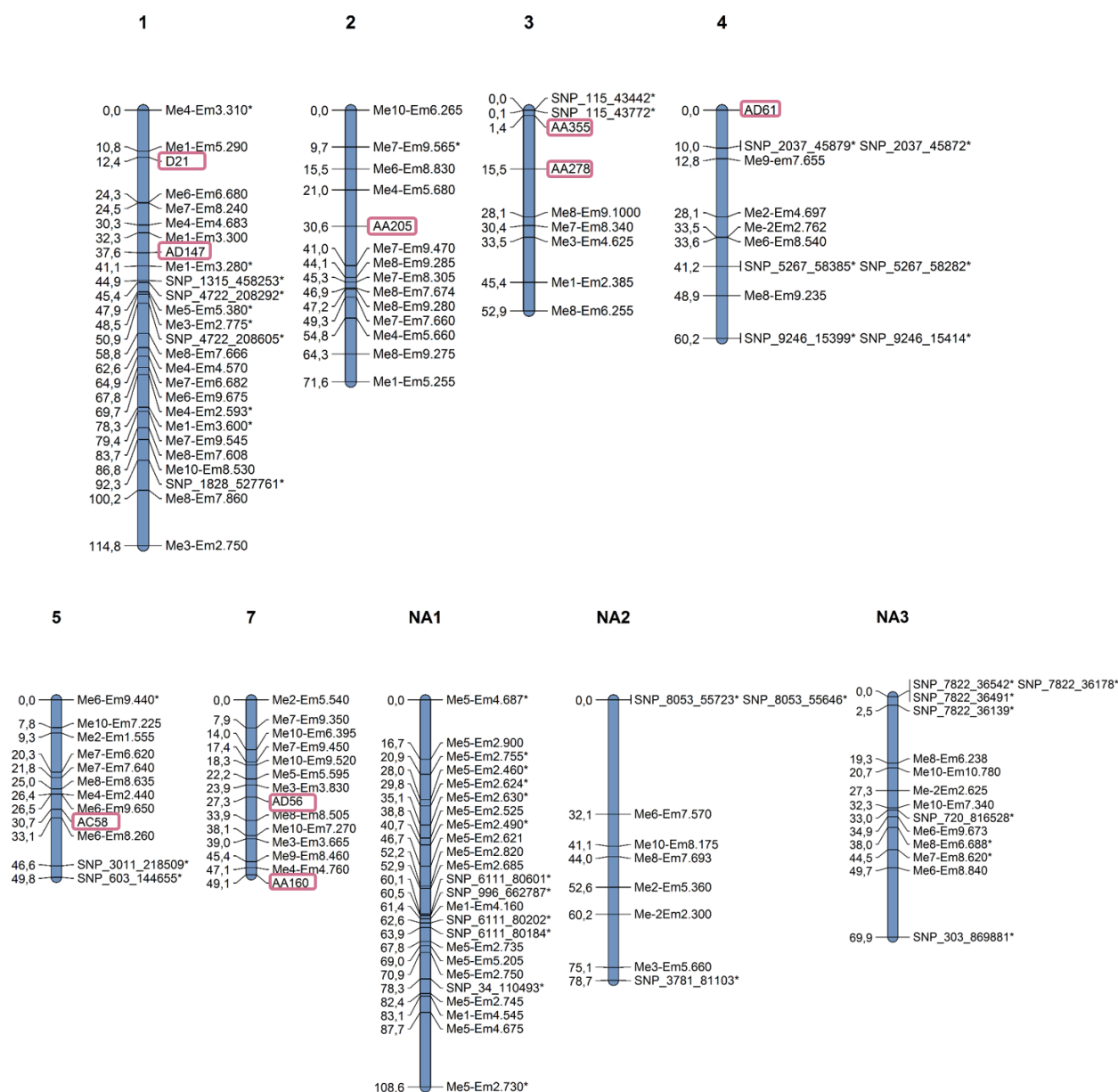


Figura 13. Mapa genético de *Pisum sativum*. El nombre de los marcadores se muestra a la derecha de cada grupo de ligamiento y las distancias en cM a la izquierda. Se indican con un asterisco los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). Los grupos de ligamiento fueron asignados en función a los marcadores SSR presentes en los mismos indicados con un recuadro rosa. NA corresponde a los grupos de ligamiento que no fueron alineados con el mapa de referencia.

8.3 Detección de QTLs

Mediante el uso combinado del mapa genético generado para la población de mapeo y los datos fenotípicos obtenidos para la población F_2 y para las familias $F_{2:3}$ en los dos ambientes, se realizó el análisis de QTL, utilizando la metodología de mapeo por intervalos compuestos (CIM). Se comprobó la distribución normal de los caracteres ($W < 0,85$) considerando los 87 individuos y familias correspondientes. Para determinar los cofactores a utilizar en el modelo se realizó, en primer lugar, el análisis por prueba simple de marcador para todos los caracteres y el análisis por intervalo simple. Además, se tuvo en cuenta el resultado del análisis de regresión que realiza el programa para determinar un ranking de cofactores. En la Tabla 31 (Sección Anexos) se muestran los marcadores seleccionados como cofactores para los caracteres en los cuales se detectaron QTLs.

Al realizar el análisis CIM se detectaron 49 QTLs en las distintas poblaciones y ambientes estudiados: nueve QTLs relacionados a AP, ocho QTLs asociados a NV, seis QTLs para AV, PS y NS, cinco QTLs para DF, cuatro QTLs para DS, tres QTLs para SV y dos QTLs para LV. En la Figura 14 se grafican en el mapa de ligamiento los QTLs encontrados y en las Figuras 15, 16 y 17 de la sección Anexos se muestran las curvas de LOD observadas en cada caso.

En la población F_2 se identificaron 20 QTLs para los caracteres AP, DF, NV, NS, SV, AV y PS, que explicaron entre 12,6 y 24,3 % de la variabilidad fenotípica observada. En la Tabla 24 se muestran los datos correspondientes a cada uno de estos QTLs. Un efecto aditivo con signo positivo indica que la presencia del alelo proveniente del progenitor Explorer provoca un incremento en el valor del carácter en la magnitud correspondiente, mientras que un efecto con signo negativo significa un aumento del valor generado por la presencia del alelo proveniente del progenitor DDR14. Por ejemplo, para el caso de df1 el alelo del parental DDR14 estaría aumentando el valor del carácter. En las familias $F_{2:3}$ se identificaron 14 QTLs para AP, DF, NV, SV, DS, AV y PS en el año 2014. Dichos QTLs explicaron entre 12,6 y 27,0 % de la variabilidad encontrada y se distribuyeron en ocho grupos de ligamiento (Tabla 25). En el año 2015 se encontraron QTLs para todos los caracteres evaluados con excepción de SV, que explicaron entre el 12,6 y el 28,4 % de la variabilidad (Tabla 26).

QTL	GL	Posición (cM)	Marcador más cercano	Distancia al marcador (cM)	LOD	Efecto aditivo	R ² %
df1	1	59,01	Me8-Em7.666	0,220	2,741	-3,799	13,5
df2	1	66,01	Me7-Em6.682	1,105	3,056	-4,275	14,9
df3	NA1	79,01	SNP_34_110493*	0,760	2,790	-1,481	13,7
ap1	2	46,01	Me8-Em7.674	0,936	3,808	-8,102	18,3
nv1	1	58,01	Me8-Em7.666	0,780	2,745	1,955	13,5
nv2	NA1	32,01	Me5-Em2.624*	2,193	3,095	13,711	15,1
nv3	NA2	27,01	Me6-Em7.570	5,097	2,867	11,012	14,1
nv4	NA2	41,01	Me10-Em8.175	0,120	2,985	9,403	14,6
ns1	1	99,01	Me8-Em7.860	1,216	3,698	-43,889	17,8
ns2	NA1	9,01	Me5-Em2.900	7,649	5,262	42,428	24,3
ns3	NA1	30,01	Me5-Em2.624*	0,193	4,177	44,332	19,8
ns4	NA2	41,01	Me10-Em8.175	0,120	2,876	25,400	14,1
ns5	NA2	54,01	Me2-Em5.360	1,452	3,070	25,764	15,0
av1	1	74,01	Me4-Em2.593*	4,275	2,835	-0,057	13,9
av2	NA1	71,01	Me5-Em2.750	0,094	2,738	-0,065	13,5
sv1	1	70,19	Me4-Em2.593*	0,455	2,550	0,109	12,6
sv2	1	76,49	Me1-Em3.600*	1,833	2,752	0,149	13,6
ps1	1	76,01	Me1-Em3.600*	2,313	2,535	0,001	12,6
ps2	3	11,01	AA278	4,480	3,208	0,003	15,6
ps3	4	45,01	SNP_5267_58385*	3,854	2,874	0,012	14,1

Tabla 24. Información de los QTLs detectados en la población F_2 evaluada en el año 2013 a través del análisis CIM. Se indican con asteriscos los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). df: QTLs para días a 50 % de floración de la parcela, ap: QTLs para altura de planta, nv: QTLs para número de vainas por planta, ns: QTLs para número de semillas por planta, av: QTLs para ancho de la vaina, sv: QTLs para número de semillas por vaina, ps: QTLs para peso de semilla. En color violeta se resaltan los QTLs que resultaron consistentes en otras generaciones.

QTL	GL	Posición (cM)	Marcador más cercano	Distancia al marcador (cM)	LOD	Efecto aditivo	R ² %
df4	NA2	41,01	Me10-Em8.175	0,120	2,643	1,237	13,1
ap2	3	10,01	AA278	5,480	5,933	6,463	27,0
ap3	7	22,01	Me5-Em5.595	0,228	5,289	-5,700	24,4
ap4	7	30,01	AD56	2,755	3,736	-5,023	17,9
ap5	NA1	3,01	Me5-Em4.687*	3,010	2,875	5,802	14,1
ap6	NA2	21,01	Me6-Em7.570	11,097	3,745	3,322	18,0
ap7	NA3	0,01	SNP_7822_36542*	0,010	3,166	3,118	15,4
ap8	NA3	44,01	Me7-Em8.620*	0,506	2,740	2,345	13,5
nv5	1	94,01	SNP_1828_527761*	1,686	2,637	8,814	13,0
nv6	5	30,01	AC58	0,685	3,019	-10,574	14,8
av3	7	38,01	Me10-Em7.270	0,095	2,914	-0,044	14,3
sv3	3	16,46	AA278	0,970	2,538	-0,252	12,6
ds1	7	42,01	Me3-Em3.665	2,964	3,155	-0,015	15,4
ps4	4	28,01	Me2-Em4.697	0,087	2,753	-0,007	13,6

Tabla 25. Información de los QTLs detectados en la población $F_{2:3}$ evaluada en el año 2014 a través del análisis CIM. Se indican con asteriscos los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). df: QTLs para días a 50 % de floración de la parcela, ap: QTLs para altura de planta, nv: QTLs para número de vainas por planta, av: QTLs para ancho de la vaina, sv: QTLs para número de semillas por vaina, ds: QTLs para diámetro de semilla, ps: QTLs para peso de semilla. En color violeta se resaltan los QTLs que resultaron consistentes en otras generaciones o ambientes.

QTL	GL	Posición (cM)	Marcador más cercano	Distancia al marcador (cM)	LOD	Efecto aditivo	R ² %
df5	2	0,01	Me10-Em6.265	0,010	2,820	2,027	13,9
ap9	3	11,01	AA278	4,480	6,309	7,455	28,4
nv7	1	82,01	Me8-Em7.608	1,729	3,014	15,856	14,7
nv8	NA3	20,01	Me10-Em10.780	0,738	2,541	-8,073	12,6
ns6	1	82,01	Me8-Em7.608	1,729	3,917	62,650	18,7
lv1	2	58,01	Me4-Em5.660	3,202	3,405	0,120	16,5
lv2	7	4,01	Me7-Em9.350	3,905	2,988	-0,031	14,6
av4	1	75,01	Me1-Em3.600*	3,313	3,485	-0,022	16,8
av5	NA2	42,01	Me10-Em8.175	0,880	3,105	-0,036	15,2
av6	NA2	48,01	Me8-Em7.693	4,007	2,905	-0,032	14,3
ds2	5	0,01	Me6-Em9.440*	0,010	2,582	0,018	12,8
ds3	NA1	7,01	Me5-Em4.687*	7,010	3,940	-0,037	18,8
ds4	NA1	19,01	Me5-Em2.755*	1,921	3,913	-0,036	18,7
ps5	2	0,01	Me10-Em6.265	0,010	2,545	-0,017	12,6
ps6	7	39,01	Me3-Em3.665	0,036	3,065	-0,012	15,0

Tabla 26. Información de los QTLs detectados en la población F_{2:3} evaluada en el año 2015 a través del análisis CIM. Se indican con asteriscos los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). df: QTLs para días a 50 % de floración de la parcela, ap: QTLs para altura de planta, nv: QTLs para número de vainas por planta, ns: QTLs para número de semillas por planta, lv: QTLs para longitud de vaina, av: QTLs para ancho de la vaina, ds: QTLs para diámetro de semilla; ps: QTLs para peso de semilla. En color violeta se resaltan los QTLs que resultaron consistentes en otras generaciones o ambientes.

Para muchos de los caracteres se detectó más de un QTL en el mismo ambiente, por lo tanto se determinó la variancia total explicada por los mismos a partir de los marcadores moleculares más cercanos para cada QTL (Tabla 27). En todos los casos los R² totales resultaron menores que la suma de los valores de R² individuales.

Carácter	Población evaluada	R ² total (%)
DF	F ₂ (2013)	21,615
AP	F _{2:3} (2014)	50,948
NV	F ₂ (2013)	26,84
NV	F _{2:3} (2014)	19,06
NV	F _{2:3} (2015)	15,777
NS	F ₂ (2013)	39,968
LV	F _{2:3} (2015)	29,41
AV	F ₂ (2013)	22,105
AV	F _{2:3} (2015)	20,117
SV	F ₂ (2013)	14,055
DS	F _{2:3} (2015)	20,89
PS	F ₂ (2013)	24,51
PS	F _{2:3} (2015)	15,794

Tabla 27. Variancia total explicada por el total de QTLs detectados para los caracteres DF (días a 50 % de floración de la parcela) en la población F₂ (2013), AP (altura de planta) en la población F_{2:3} (2014), NV (número de vainas por planta) en las tres poblaciones estudiadas, NS (número de semillas por planta) en la población F₂ (2013), LV (longitud de la vaina) en la población F_{2:3} (2015), SV (número de semillas por vaina) en la población F₂ (2013), DS (diámetro de semilla) en la población F_{2:3} (2015), PS (peso de semilla) en las poblaciones F₂ (2013) y F_{2:3} (2015).

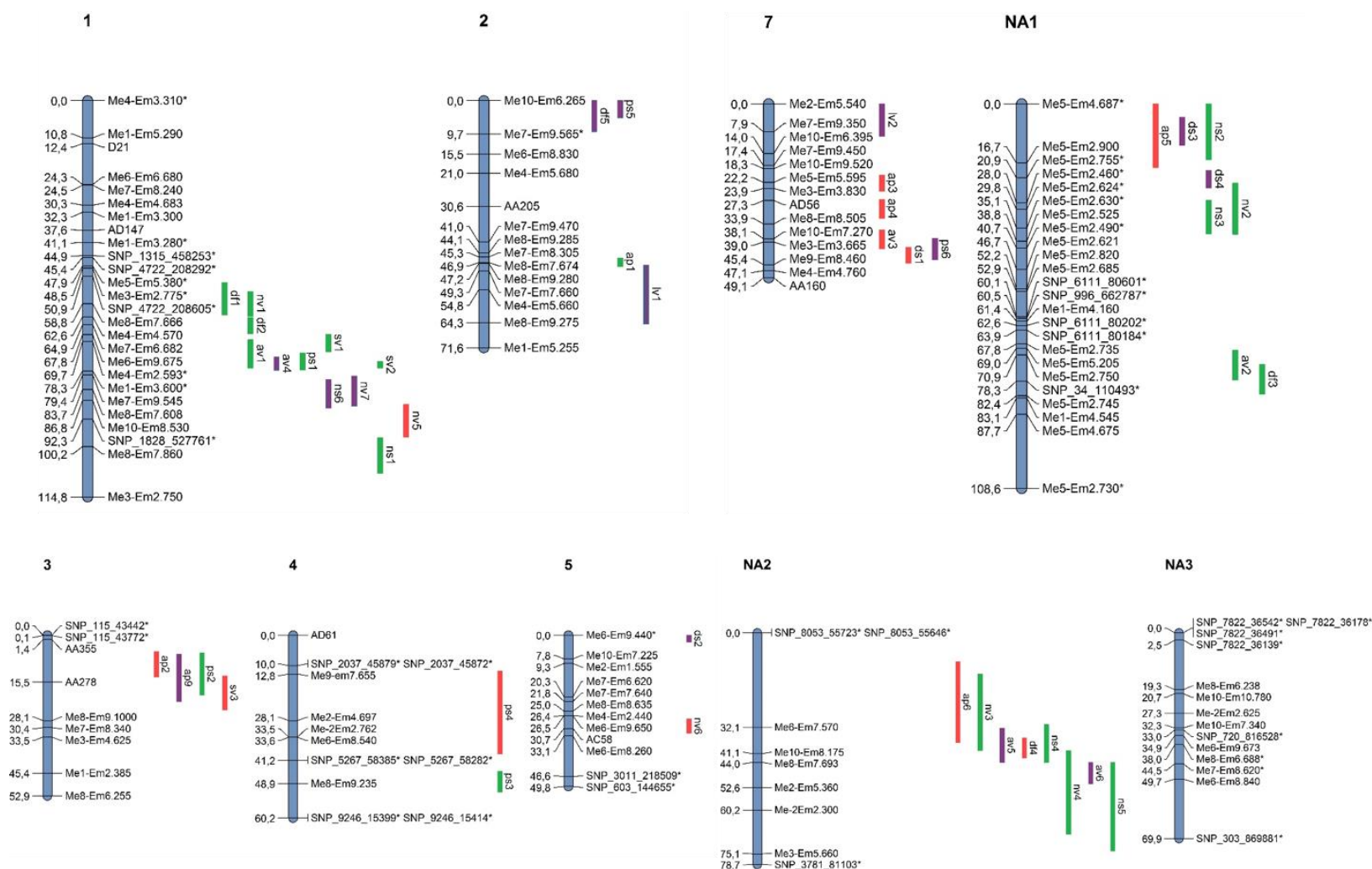


Figura 14. Posición de los QTLs asociados a los caracteres de interés en arveja detectados en la población derivada del cruzamiento de Explorer y DDR14 por el método CIM utilizando el mapa genético de *Pisum Sativum* generado a partir de los marcadores SSR, SRAP y SNP. Se indica con un asterisco los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). Se muestran los QTLs detectados en la población F₂ con color rosa, los detectados en la población F_{2,3} evaluada en el 2014 con color verde y los de la población F_{2,3} evaluada en el 2015 con color violeta.

Al comparar las asociaciones encontradas en la población F_2 y en las familias $F_{2:3}$ se observó la superposición de intervalos de confianza para tres caracteres: NV, AP y SV. Los QTLs además de ubicarse en la misma región tienen efectos aditivos del mismo signo, por lo cual se puede suponer que se trata del mismo QTL. Los QTLs ap2 y ap9, detectados en la población $F_{2:3}$ en los dos ambientes evaluados, se encuentran en el GL 3 (10 cM en el 2014, 11 cM en el 2015) y explican cerca del 28 % de la variancia fenotípica observada. El marcador más cercano en ambos casos es el microsatélite AA278 (5,5 cM en el 2014, 4,5 cM en el 2015). La presencia del alelo del padre Explorer explicaría el aumento en los valores del carácter. Por otro lado, los QTL av1 y av4, ubicados en el GL 1 (74 cM en la población F_2 evaluada en el año 2013 y 75 cM en la $F_{2:3}$ evaluada en el 2015) explican alrededor del 15 % de la variancia. En este caso los marcadores más cercanos detectados fueron Me4-Em2.593 (F_2 , 2013) a 4,3 cM y Me1-Em3.600 ($F_{2:3}$, 2015) a 3,3 cM y es DDR14 el que aportaría el alelo que aumenta el carácter. Los QTLs nv5 y nv7 detectados en la población $F_{2:3}$ en los dos ambientes evaluados se ubican en el GL 1 pero sus regiones no están tan solapadas como en los casos anteriores (94 cM en el 2014, 84 cM en el 2015). Los QTLs explican cerca del 14 % de la variancia fenotípica observada. Los marcadores más cercanos son SNP_1828_527761 (1,686 cM en el 2014) y Me8-Em7.608 (1,729 cM en el 2015) y Explorer aporta el alelo que aumenta el carácter.

Muchos QTLs se concentraron en determinadas regiones del genoma, pudiendo tratarse del mismo QTL involucrado en el control de los distintos caracteres. De los QTLs detectados en la población F_2 podrían estar relacionados df1 y nv1 (GL 1), av1, ps1 y sv2 (GL 1), nv2 y ns3 (GL NA1), av2 y df3 (GL NA1) y ns5 y nv4 (GL NA2). En la población $F_{2:3}$ evaluada en el 2014 se superpusieron los intervalos de ap2 y sv3 (GL 3) y av3 y ds1 (GL 7), mientras que en el 2015 podrían estar relacionados ns6 y nv7 (GL1) y ps5 y df5 (GL 2). Si consideramos los QTLs detectados en las distintas generaciones y ambientes en conjunto se pueden observar regiones donde se superponen los intervalos de confianza de múltiples QTLs asociados a distintos caracteres en el GL 1, GL 3, GL 7, GL NA1 y GL NA2.

De acuerdo a los QTLs encontrados ambos padres están aportando alelos que aumentan los valores de todos los caracteres, excepto para el caso de AV donde sólo DDR14 aporta alelos que aumentan el valor del carácter.

8.3.1 Detección de QTLs con marcadores no ligados

Se evaluaron los marcadores con segregación mendeliana que no pudieron ser incorporados a ningún grupo de ligamiento a través de una regresión linear simple, declarándose QTLs a las asociaciones con un $p \leq 0,05$. De esta manera se validaron 37 nuevos QTLs: uno para AP, tres para DF, tres para DS, seis para LV, diez para AV, tres para NS, cuatro para NV y siete para PS (0,43-23,4 %). Nuevamente se observa la presencia de regiones comunes que controlan la herencia de los caracteres dado que los marcadores Me10-Em7.510, Me10-Em8.150, Me1-Em3.710, Me2-Em5.205, Me3-Em3.650, Me3-Em3.685, Me7-Em7.570, Me7-Em8.265 y Me8-Em7.641 presentaron asociaciones con más de un carácter.

<i>QTL</i>	<i>Población</i>	<i>Marcador</i>	<i>p</i>	<i>R² (%)</i>
df6	F _{2:3} (2014)	Me10-Em8.150	0,031	4,59
df6	F _{2:3} (2015)	Me10-Em8.150	0,003	12,30
df7	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.205	0,031	10,28
df7	F ₂ (2013)	Me2-Em5.205	0,049	4,16
df8	F _{2:3} (2015)	Me4-Em4.865	0,010	6,78
df8	F ₂ (2013)	Me4-Em4.865	0,047	6,94
ap10	F _{2:3} (2014)	Me10-Em10.805	0,003	8,20
ap10	F _{2:3} (2015)	Me10-Em10.805	0,022	3,42
nv9	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.205	0,000	23,41
nv9	F ₂ (2013)	Me2-Em5.205	0,046	7,99
nv10	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.650	0,027	4,61
nv10	F ₂ (2013)	Me3-Em3.650	0,026	4,46
nv11	F _{2:3} (2014)	Me5-Em2.700	0,020	4,84
nv11	F _{2:3} (2015)	Me5-Em2.700	0,017	5,91
nv12	F _{2:3} (2014)	Me5-Em4.698	0,046	3,71
nv12	F ₂ (2013)	Me5-Em4.698	0,020	6,50
ns7	F _{2:3} (2014)	Me1-Em3.710	0,048	2,15
ns7	F _{2:3} (2015)	Me1-Em3.710	0,033	3,68
ns8	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.205	0,000	17,38
ns8	F ₂ (2013)	Me2-Em5.205	0,040	9,10
ns9	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.650	0,020	5,22
ns9	F ₂ (2013)	Me3-Em3.650	0,014	5,93
lv3	F _{2:3} (2014)	Me6-Em7.410	0,036	7,05
lv3	F ₂ (2013)	Me6-Em7.410	0,003	7,69
lv4	F _{2:3} (2015)	Me7-Em8.265	0,008	8,86
lv4	F ₂ (2013)	Me7-Em8.265	0,047	4,63
lv5	F _{2:3} (2014)	Me10-Em7.510	0,015	1,39
lv5	F _{2:3} (2015)	Me10-Em7.510	0,020	1,18
lv6	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.203	0,001	10,90
lv6	F ₂ (2013)	Me2-Em5.203	0,020	6,71
lv7	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.205	0,002	12,31
lv7	F ₂ (2013)	Me2-Em5.205	0,038	4,77
lv8	F _{2:3} (2014)	Me4-Em3.470	0,024	1,33
lv8	F _{2:3} (2015)	Me4-Em3.470	0,039	6,99

lv8	F ₂ (2013)	Me4-Em3.470	0,010	4,14
av7	F _{2:3} (2014)	Me7-Em7.630	0,035	5,74
av7	F _{2:3} (2015)	Me7-Em7.630	0,035	5,74
av7	F ₂ (2013)	Me7-Em7.630	0,003	6,08
av8	F _{2:3} (2014)	Me7-Em7.570	0,029	4,85
av8	F _{2:3} (2015)	Me7-Em7.570	0,029	4,85
av9	F ₂ (2013)	Me7-Em7.570	0,005	5,65
av9	F _{2:3} (2014)	Me7-Em8.265	0,027	7,56
av9	F _{2:3} (2015)	Me7-Em8.265	0,027	7,56
av10	F _{2:3} (2014)	Me10-Em7.510	0,002	3,86
av10	F _{2:3} (2015)	Me10-Em7.510	0,002	3,86
av11	F _{2:3} (2014)	Me1-Em2.270	0,049	5,18
av11	F _{2:3} (2015)	Me1-Em2.270	0,049	5,18
av11	F ₂ (2013)	Me1-Em2.270	0,049	5,71
av12	F _{2:3} (2014)	Me1-Em5.300	0,020	4,94
av12	F _{2:3} (2015)	Me1-Em5.300	0,020	4,94
av13	F _{2:3} (2014)	Me3-Em2.820	0,048	6,44
av13	F _{2:3} (2015)	Me3-Em2.820	0,048	6,44
av14	F _{2:3} (2014)	Me3-Em3.650	0,013	5,85
av14	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.650	0,013	5,85
av15	F _{2:3} (2014)	Me3-Em3.875	0,041	2,01
av15	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.875	0,041	2,01
av16	F ₂ (2013)	Me3-Em3.685	0,025	7,25
av16	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.685	0,046	5,00
ds5	F _{2:3} (2014)	Me8-Em7.641	0,000	15,31
ds5	F ₂ (2013)	Me8-Em7.641	0,016	7,27
ds6	F _{2:3} (2015)	Me1-Em3.710	0,041	3,25
ds6	F ₂ (2013)	Me1-Em3.710	0,011	8,82
ds7	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.685	0,049	6,33
ds7	F ₂ (2013)	Me3-Em3.685	0,035	5,99
ps7	F _{2:3} (2014)	Me7-Em7.570	0,024	5,35
ps7	F _{2:3} (2015)	Me7-Em7.570	0,043	4,04
ps8	F _{2:3} (2014)	Me7-Em8.265	0,008	9,59
ps8	F _{2:3} (2015)	Me7-Em8.265	0,003	10,27
ps8	F ₂ (2013)	Me7-Em8.265	0,040	3,90
ps9	F _{2:3} (2015)	Me8-Em7.641	0,004	12,95
ps9	F ₂ (2013)	Me8-Em7.641	0,015	6,91
ps10	F _{2:3} (2014)	Me10-Em8.150	0,021	13,48
ps10	F _{2:3} (2015)	Me10-Em8.150	0,004	12,42
ps11	F _{2:3} (2014)	Me2-Em5.205	0,007	13,24
ps11	F _{2:3} (2015)	Me2-Em5.205	0,005	10,38
ps12	F _{2:3} (2014)	Me3-Em2.825	0,024	0,43
ps12	F _{2:3} (2015)	Me3-Em2.825	0,028	2,10
ps13	F _{2:3} (2015)	Me3-Em3.685	0,005	10,62
ps13	F ₂ (2013)	Me3-Em3.685	0,027	6,41

Tabla 28. Información de QTLs detectados por análisis de marcador simple ($p < 0,05$). df: QTLs para días a 50 % de floración de la parcela, ap: QTLs para altura de planta, nv: QTLs para número de vainas por planta, ns: QTLs para número de semillas por planta, lv: QTLs para longitud de vaina, av: QTLs para ancho de la vaina, ds: QTLs para diámetro de semilla, ps: QTLs para peso de semilla.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis se enmarca en el programa de Mejoramiento de Legumbres de la Cátedra de Mejoramiento Vegetal de La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, y con él se pretende ampliar el conocimiento del control genético de varios caracteres de interés agronómico para la mejora de la arveja en las condiciones de cultivo de la provincia de Santa Fe.

La arveja ocupa un área de cultivo considerable a nivel mundial (6,9 millones de hectáreas (FAO, 2014)) y constituye un componente importante de la dieta humana, debido a su alto contenido proteico. Esta leguminosa de grano tiene la capacidad de fijar nitrógeno, lo que reduce el uso de fertilizantes en la agricultura. A pesar de sus beneficios, la producción mundial de arveja ha aumentado marginalmente en los últimos 50 años al compararla con otros cultivos. Entre 1961 y 2012, los avances de la Revolución Verde llevaron a aumentos masivos en el rendimiento y producción de muchos alimentos básicos gracias a la industrialización de la agricultura. Durante este período, maíz, trigo, arroz y soja vieron aumentos de la producción acumulada de entre el 200 y 800 %, mientras que las legumbres sólo crecieron el 59 % (FAO, 2015). En cambio, la demanda de legumbres ha ido aumentando en el tiempo. En muchos países, la población está creciendo a un ritmo que supera al de la producción agrícola. Es el caso de países como China e India, los cuales se ven obligados a importar este tipo de alimentos. En Sudamérica el principal productor y exportador de arvejas es Argentina; mientras que Colombia, Perú y Brasil, si bien son destacados productores, deben recurrir a la importación con el propósito de abastecer sus propios mercados. Las variedades normalmente utilizadas en nuestro país, Viper y Facón, han sido desarrolladas en Holanda y Estados Unidos, respectivamente, en condiciones ambientales diferentes a la zona de producción. Esto trae aparejado inconvenientes asociados a la calidad del producto o a su baja rentabilidad, ya sea por su baja producción o por la incidencia de enfermedades, que interfieren en la obtención de una mayor producción, por lo que se genera la necesidad de desarrollar nuevas variedades con mayor rendimiento, mejores características nutricionales y adaptación local.

Los programas de mejoramiento se basan principalmente en explotar el germoplasma a través de selección o hibridaciones seguidas de selección, por lo tanto el conocimiento de la variabilidad

genética es esencial para la elección de las líneas parentales que se van a utilizar en los cruzamientos. La inclusión de métodos de selección asistida por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento, combinados con los métodos convencionales de selección, puede incrementar la eficiencia del programa, reduciendo costos y tiempo. Además, mediante la utilización de marcadores moleculares es posible acelerar la transferencia de genes deseables entre distintas variedades, así como también la introgresión de nuevos genes a partir de especies silvestres relacionadas (Tourè *et al.*, 1999), constituyéndose en un factor clave para incrementar la competitividad del programa. Asimismo, la posibilidad de construir mapas de ligamiento genético es una de las contribuciones de mayor impacto de las técnicas de marcadores moleculares ya que permite la selección indirecta de genotipos deseables, comúnmente denominada *MAS (Marker Assisted Selection)*, además de la identificación de QTLs responsables de caracteres de importancia agronómica.

El programa de mejoramiento genético de arveja de la Facultad de Ciencias Agrarias comenzó con la evaluación de 23 accesiones, durante los años 2008 y 2009 (Espósito *et al.*, 2014). Dicho estudio determinó que las variedades DDR14 y Explorer presentan características de interés agronómico pero, además, resultan divergentes tanto a nivel morfológico como molecular, lo que incrementa las probabilidades de lograr nuevas combinaciones génicas favorables a partir del cruzamiento entre ambas. Las plantas pertenecientes a la variedad DDR14 son foliosas, con estípulas alargadas, vainas de tamaño grande y granos de calibre grande, color amarillo y tegumento crema; mientras que Explorer presenta plantas semiáfilas, con estípulas redondeadas, vainas más cortas y granos de calibre medio, color verde y tegumento incoloro. Durante los años 2011, 2012 y 2013, Almirón (2015) evaluó la diversidad genética disponible en la colección activa del género *Pisum* utilizada en el programa de mejoramiento antes mencionado. A partir de la evaluación de 26 descriptores morfológicos, fenológicos y agronómicos en 126 accesiones, dentro de las cuales se incluían DDR14 y Explorer, determinó que ambas líneas presentaban diferencias significativas para los caracteres AP, DF, LV, DS y PS. El análisis de varianza realizado en el presente trabajo de tesis entre ambos parentales a partir de los datos fenotípicos obtenidos durante los años 2013, 2014 y 2015 determinó la presencia de IGA para los caracteres DF, NV, NS y LV. Cuando se analizaron los datos obtenidos en cada uno de los años, se establecieron diferencias significativas entre ambos progenitores para los caracteres en cuestión,

en al menos un ambiente. Por otro lado, para los caracteres AP, AV y DS no se observó interacción genotipo por ambiente pero tampoco diferencias entre ambos genotipos en ninguno de los ambientes evaluados. A pesar de no haberse observado diferencias para estos caracteres entre DDR14 y Explorer, la población derivada de dicho cruzamiento puede ser utilizada para detectar QTLs asociados a los mismos ya que, por tratarse de caracteres controlados por múltiples genes, las líneas parentales pueden presentar fenotipos similares para el carácter en cuestión, pero contener alelos diferentes en los distintos loci que rigen el carácter. Los mismos son reordenados durante la recombinación produciendo una gama de valores fenotípicos en la población segregante (Miles y Wayne, 2008).

En numerosas especies autógamas, tales como soja (Bi *et al.*, 2015), poroto (Ceyhan *et al.*, 2014) y tomate (Kumar y Singh, 2016), se han realizado estudios de heterosis con el fin de utilizar los datos de rendimiento de los híbridos F₁ en la determinación de los cruzamientos más prometedores. La generación F₁ puede ser utilizada entonces para evaluar el potencial que presenta una crusa determinada para generar segregantes transgresivos en las generaciones futuras (Sarawat *et al.*, 1994). La presencia de familias transgresivas en las poblaciones segregantes demuestra la ampliación de la variabilidad genética en la población, la cual es requerida para llevar a cabo con éxito los procesos de selección de genotipos superiores. Por otra parte, no es aceptable considerar a la heterosis sólo por la mayor expresión de un carácter (heterosis positiva), ya que una menor expresión (heterosis negativa) puede resultar favorable para algunos caracteres. En arveja para el carácter indicador de precocidad DF se considera propicio un valor negativo debido a que uno de los objetivos más importantes de la mejora de este cultivo es la obtención de materiales precoces (con fechas a floración cercanas a 70 días), los cuales pueden ser utilizados en rotación con el cultivo de soja. Lo mismo ocurre con el carácter AP; alturas de 60-65 cm resultan favorables para el cultivo ya que plantas de mayor altura son más susceptibles al vuelco, mientras que, las de menor altura resultan malas competidoras con las malezas, por tanto también son válidos, en algunos casos, valores negativos de heterosis. En cambio, para aquellas variables que presentan impacto directo sobre el rendimiento tales como NV, NS, LV y DS (Togay *et al.*, 2008; Espósito *et al.*, 2009; Rashwan y El-Shaieny, 2016) es necesario obtener valores de heterosis positivos. El cruzamiento entre Explorer y DDR14 fue evaluado previamente en cuanto a la heterosis para rendimiento, obteniéndose un valor de 8,8 %

(Espósito *et al.*, 2014). En el presente trabajo se evaluó la heterosis para caracteres relacionados al rendimiento en dos ambientes (años 2014 y 2015), observándose valores de heterosis superiores al 50 % para NV y NS en ambos ambientes, mientras que la variable DS manifestó un menor porcentaje de heterosis (13 %) y en un solo ambiente (2015). Estas diferencias que ocurren debido a las diferencias ambientales ponen en evidencia la importancia de realizar las determinaciones en el lugar en el que se llevarán a cabo los experimentos de selección, con repeticiones en el tiempo, cuando se quieren obtener estimaciones válidas de la heterosis dentro de un programa de mejora. En los mismos caracteres en los que se observaron mayores porcentajes de heterosis también se detectaron los mayores porcentajes de familias transgresivas, 10 % para NV y NS durante los dos años y un 25 % para DS en el 2015.

Las familias $F_{2:3}$ fueron evaluadas con respecto a distintos caracteres relacionados al rendimiento, se analizó la variabilidad existente, se estimó la heredabilidad en sentido estricto y se calcularon las correlaciones entre los caracteres, parámetros importantes para el establecimiento de criterios de selección. Los parámetros de variabilidad evaluados revelaron una amplia variación entre las familias $F_{2:3}$. Los mayores rangos se encontraron para NV y NS, con un CV mayor a 35 % en todas las generaciones y ambientes estudiados, lo cual resulta de interés para su explotación en el programa de mejoramiento genético de la arveja ya que diversos trabajos han puesto de manifiesto la influencia directa de estos dos componentes en el rendimiento del cultivo (Togay *et al.*, 2008; Espósito *et al.*, 2009).

La variabilidad presente en distintas poblaciones de arveja ha sido estudiada por numerosos autores. Fikreselassie (2012) evaluó diversos caracteres cuantitativos en 25 líneas elite de arveja provenientes de Etiopía, entre los cuales se incluían DF, AP, PS, NV, NS y SV. Si bien el autor no menciona cuáles fueron los materiales a partir de los cuales se originaron estas líneas, obtuvo valores de CV similares a los observados en la población generada en la presente tesis, los que variaron entre 11,52 % para DF y 26,42 % para NS. El valor promedio de las líneas evaluadas para DF fue de 57,05 días, resultando más precoces que las familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre Explorer y DDR14, donde los promedios observados fueron mayores a 80 días en ambos años. Sin embargo, las líneas elite evaluadas por Fikreselassie (2012) presentaron AP elevadas (promedio de 188 cm) al compararlo con nuestra población (78,83 y 93,62 cm) lo que podría indicar una mayor predisposición al vuelco durante el cultivo. Además, dichas líneas

presentaron valores promedio muy bajos para NV (8,4) y NS (24,7) indicando bajos rendimientos en comparación con la población generada en el presente trabajo en el que se obtuvieron valores promedio de 44,38 y 57,78 para NV y 125,93 y 194,23 para NS en los dos años evaluados. Los valores observados para PS y SV resultaron similares en ambos estudios. Asimismo, Georgieva *et al.* (2016) compararon cinco líneas de arveja provenientes de Ucrania, sin indicar el origen genético de las mismas. Reportaron valores de CV moderados para AP, NV, NS (entre 11,26 y 15,63 %) y bajos para AV y LV (3,23 y 4,93 %). Los promedios observados en este caso resultaron similares a los de las familias generadas para el desarrollo de esta tesis para los caracteres AP (72,98 cm), LV (5,39 cm) y AV (0,98 cm). En cambio se observaron diferencias en los valores medios para NV (5,813) y NS (21,11), que resultaron menores al compararlos con las familias generadas a partir del cruzamiento entre Explorer y DDR14. Los resultados obtenidos por estos autores son dispares, debido al diferente material genético utilizado, y a que el mismo fue evaluado en distintas condiciones ambientales; sin embargo, es importante notar el potencial que muestra el cruzamiento entre Explorer y DDR14 en cuanto al incremento en los valores de NV y NS al compararlas con las líneas evaluadas en los demás estudios. Almirón (2015) reportó valores de CV mayores para todos los caracteres evaluados en comparación con los obtenidos en el presente trabajo, lo cual es razonable si se tiene en cuenta que dentro de dicho estudio se incluyeron tanto variedades cultivadas como silvestres pertenecientes a la colección de germoplasma de la especie. Asimismo, los rangos observados por Almirón (2015) son más amplios y muestran valores más extremos para todos los caracteres respecto a los observados en nuestra población. De igual manera, es importante resaltar que los valores máximos para NS y NV detectados en materiales silvestres de la colección de germoplasma fueron de 204 vainas y 490 semillas, los mismos no difieren mucho del valor máximo observado para las familia F_{2:3} durante el año 2015 (146,7 vainas y 482,7 semillas), avalando el elevado potencial de rendimiento para la especie que presenta la cruce entre Explorer y DDR14.

Cuando se evalúan caracteres de gran importancia agronómica y económica, como el rendimiento, es necesario realizar ensayos en diferentes ambientes para comprender mejor el comportamiento de los genotipos. Puede evaluarse de esta manera la interacción genotipo por ambiente (IGA), que puede definirse como la expresión genotípica diferencial a través de los ambientes y se considera un aspecto muy importante en los programas de mejora. Para las

familias $F_{2:3}$ evaluadas se observó IGA para todos los caracteres evaluados. Cuando se analizó el comportamiento de cada familia individualmente se observó que la mayoría de las familias en las que se detectaron diferencias significativas entre los ambientes, presentaron mejor comportamiento durante el año 2015. Las diferencias en las temperaturas registradas durante los dos años de evaluación podrían haber influido sobre el comportamiento de estas familias. Las temperaturas óptimas para la germinación, crecimiento vegetativo y ciclo reproductivo de la arveja oscilan entre 14 y 19 °C. En las etapas de crecimiento vegetativo, con temperaturas inferiores a 4 °C, las plantas detienen su desarrollo y por debajo de -5 °C se hielan y mueren. Durante el ciclo reproductivo, temperaturas inferiores a 14 °C dificultan la fecundación por un crecimiento muy lento de los tubos polínicos, por el otro lado, cuando las temperaturas superan los 28-30 °C se acelera el ciclo reproductivo observándose falta de fecundación, aborto de flores y aceleración de la maduración de la vaina, lo que trae como consecuencia la formación de vainas de menor tamaño y con menor número de granos, vainas con granos formados y sin fecundar y una reducción en el número de vainas por planta (Brandan y Ploper, 1999). El período de inicio de llenado de los granos es crítico para la determinación del rendimiento de la arveja, ya que es el momento en el que se define el número final de semillas por unidad de superficie (Meadley y Milbourn, 1971). Las temperaturas registradas en la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias en la etapa de llenado de granos fueron más elevadas durante el 2014, donde se detectaron temperaturas máximas de 28°C que podrían haber afectado el desarrollo de las flores y vainas. Las condiciones durante las etapas reproductivas en el 2015 fueron óptimas, registrándose uno de los octubres más frescos de los últimos años, y sin heladas que impactaran sobre el desarrollo normal del cultivo. Las mejores condiciones de llenado de granos durante el 2015 pueden haber influido en el mayor NV y NS que se ha observado. Por otro lado, el cultivo requiere de 350 a 500 mm para completar el ciclo vegetativo (Ruiz Corral *et al.*, 2013). Si bien en el 2014 las precipitaciones acumuladas fueron un poco más bajas que en el 2015 (350,20 y 413,10 mm, respectivamente) esta variante climática no debería haber influido sobre el cultivo, debido a que durante los ensayos realizados en el presente trabajo se utilizó un sistema de riego artificial que permitió suplir las posibles deficiencias naturales.

La presencia de IGA significativa impide la comparación entre familias en los distintos ambientes, por lo tanto en la población $F_{2:3}$ estudiada fue necesario evaluar los datos

considerando cada ambiente por separado para poder estimar las variancias entre y dentro de las familias $F_{2:3}$. Utilizando esos datos fue posible estimar la heredabilidad en sentido estricto, que refleja la contribución de la variancia aditiva a la expresión fenotípica del carácter. Para todos los caracteres evaluados se obtuvieron valores intermedios o altos, adecuados para la realización de estudios precisos de mapeo. Estos valores elevados de heredabilidad indican que se podría obtener una ganancia genética rápida a través de la selección para los distintos caracteres. Sin embargo, la presencia de IGA podría limitar la correspondencia de estos valores estimados con los valores observados. Timmerman-Vaughan *et al.* (2005), a partir de una población F_2 derivada del cruzamiento entre las líneas Primo y OSU442-15, y sus familias $F_{2:3}$ evaluadas en tres ambientes, obtuvieron valores de heredabilidad en sentido estricto de 95,7 % para PS y 80,3 % para NS. En el presente trabajo, los valores obtenidos para PS resultaron inferiores (38,6 y 42,2 % en los años 2014 y 2015, respectivamente); sin embargo, para el carácter NS, si bien el valor obtenido en el año 2014 fue inferior (51,7 %), se alcanzó un valor de 89,3 % en el año 2015. Gomez y Ligarreto (2012) evaluaron diez generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 , BC_2 y cada generación recíproca), originadas a partir de un cruzamiento entre las variedades Santa Isabel y WSU31, en dos ambientes distintos y calcularon la heredabilidad para diferentes caracteres a partir de los componentes de variancia obteniendo valores intermedios a elevados (entre 54 y 90 %) para los caracteres AP, VP, SP, LV, AV y PS y bajo para SV (10 y 30 % en cada uno de los ambientes). Kosev *et al.* (2012) obtuvieron valores bajos de heredabilidad en sentido estricto, entre 0,01 y 44 % para los caracteres AP, NV, NS, SV y PS en un estudio donde evaluaron las generaciones F_1 y F_2 generadas a partir de dos cruzamientos y sus recíprocos. Muchos de estos resultados difieren de los generados en este trabajo, pero es necesario tener presente que las estimaciones de este parámetro son específicas para la población y para las condiciones ambientales en las que se realiza la evaluación. Nuevamente se demuestra la importancia de no utilizar esquemas de selección basados en las determinaciones obtenidas en otras regiones y con otros genotipos al trabajar con caracteres cuantitativos, especialmente aquellos relacionados al rendimiento.

El rendimiento es producto de muchos caracteres correlacionados y depende de la compensación entre los mismos. El conocimiento del grado y la dirección de la asociación entre estos caracteres es otro de los parámetros que se deben considerar para llevar a cabo un programa de selección

eficiente, a fin de determinar cómo pueden modificarse los caracteres cuando se efectúa la selección. Las correlaciones fenotípicas pueden ser estimadas directamente a partir de los valores medios observados a campo, pero tienen poco valor práctico y pueden conllevar a errores, pues incluyen la asociación entre caracteres tanto de naturaleza genética como ambiental. En cambio, la correlación genotípica es la porción genética de dicha correlación y por tanto la que determina si la selección a favor o en contra de un determinado carácter puede o no modificar la expresión de otro. El hecho de que se hayan observado correlaciones genéticas mayores en magnitud que las fenotípicas es explicado por la influencia de factores ambientales que afectan la expresión de los diferentes caracteres a veces en el mismo sentido y otras en sentido contrario. Asimismo, las diferentes condiciones ambientales durante ambos años de evaluación provocaron que los valores de correlación variaran entre los ambientes. Se detectó una correlación genética elevada y positiva (superior al 90 %) entre los caracteres NV y NS en ambos ambientes. Estos valores confirman los resultados obtenidos por Espósito *et al.* (2009) y Georgieva *et al.* (2015), que detectaron valores de correlación genética entre estos caracteres cercanos al 80 %. El carácter AV mostró correlación positiva con LV, aunque de distinta magnitud en los dos años evaluados (49,2 y 30,8 %). La misma asociación fue observada por Avcı y Ceyhan (2006) al evaluar siete líneas de arveja y por Ligarreto y Ospina (2009) evaluando diez progenies F₂. El carácter AP mostró una correlación genética significativa aunque con bajos valores (31,8 y 48,6 %) con PS. Ligarreto y Ospina (2009) también observaron una correlación positiva entre estos caracteres aunque de mayor magnitud (70,2%). Este tipo de asociación no sería beneficiosa para el mejoramiento de arveja para consumo fresco, debido a que, como se mencionó anteriormente, plantas altas resultan más susceptibles al vuelco mientras que un peso de semilla elevado es de interés ya que se asocia directamente a altos rendimientos. En cambio, no sería un problema si el destino del grano fuera la industria donde son requeridos granos de tamaño mediano o chico. Por último, DF presentó una correlación negativa con AV (-69,9 %) en el año 2014, similar a lo observado por Ligarreto y Ospina (2009) (-68,1 %). DF también presentó una correlación negativa con LV (-42,8 y -54,2 %), observada también por Tiwari y Lavanya (2012) (-79 %). Estas asociaciones resultarían apropiadas para cumplir los objetivos de precocidad y mayor tamaño de vaina. Muchas de las complicaciones que se tienen en la selección de materiales a partir del análisis de caracteres fenotípicos pueden ser minimizadas a través de la identificación directa de los

genotipos mediante el uso de marcadores moleculares. La inclusión de métodos de selección asistida por marcadores moleculares en los programas de mejoramiento, combinados con los métodos convencionales de selección, puede incrementar la eficiencia del programa, reduciendo costos y tiempo. La construcción de mapas genéticos consisten en un primer paso para muchas de las aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento vegetal: permiten la localización de genes o QTL (*Quantitative Trait Loci*) asociados con caracteres de interés agro-económico, facilitan la selección asistida por marcadores, permiten el mapeo comparativo entre especies diferentes, generan un marco para anclar mapas físicos y originan una base para el clonado posicional de genes (Semagn *et al.*, 2006).

Los mapas genéticos se construyen usando diferentes tipos y tamaños de poblaciones, distintos tipos de marcadores, procedimientos y software estadísticos. Cada factor afecta la eficiencia del proceso de mapeo, siendo de gran importancia los referidos a la población de mapeo. Se pueden originar diferencias en las distancias genéticas entre los marcadores debido a las variaciones en el grado de recombinación observado en los diferentes cruzamientos. En estudios de simulación, poblaciones de 500 a 1000 individuos generaron mapas muy precisos. Sin embargo, estos tamaños poblacionales no son viables, debido al costo, espacio, tiempo y labores requeridos para su evaluación. Una población de mapeo constituida por 200 individuos se considera suficiente para la construcción de mapas de eficiencia razonable (Ferreira *et al.*, 2006). El tamaño de las poblaciones desarrolladas en arveja para llevar a cabo análisis de mapeo variaron desde 38 RIL (Ellis *et al.*, 1992) a 227 individuos F₂ (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005). En el presente trabajo, la población F₂ sembrada en el año 2013, consistió de 200 individuos. Sin embargo, de acuerdo a los datos meteorológicos de la Estación de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.R., durante la segunda semana de setiembre del 2013 se observaron temperaturas superiores a 28 °C que pueden haber afectado el inicio de la floración de las plantas F₂ y, por lo tanto, el número final de semillas producidas. Por tal motivo, sólo 110 individuos produjeron suficiente cantidad de semillas F_{2:3} como para ser evaluadas luego en dos ambientes. Posteriormente, debido a la cantidad de datos perdidos durante el genotipado el tamaño final de la población de mapeo se redujo a 87 individuos a partir de los cuales se realizó el mapa de ligamiento y el posterior análisis de detección de QTLs. Se han reportado mapas de ligamiento para distintas especies con poblaciones de mapeo de tamaño similar, como es el caso del mapa desarrollado

para alcaucil por Martín *et al.* (2013) utilizando 91 individuos, el mapa desarrollado para algodón por Badigannavar y Myers (2015) con 94 individuos F₂, y el mapa desarrollado para colza por Huang *et al.* (2016) con 94 RIL.

El constante desarrollo de nuevas técnicas de marcadores moleculares ha permitido aumentar el número de loci identificados en los mapas genéticos. Existen numerosos tipos de marcadores, cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas. Para determinar la utilidad de un sistema de marcadores son tenidos en cuenta diversos factores tales como la abundancia en el genoma de un potencial marcador, su disponibilidad y costo. Dado que para arveja aún no se dispone de un genoma de referencia de alta calidad, los marcadores que no requieren información de secuencias resultan de gran utilidad para la especie, tales como el sistema de marcadores SRAP diseñado por Li y Quiros (2001). Dichos marcadores se establecieron como una herramienta poderosa para la construcción de mapas de ligamiento genético en *Brassica* (Li y Quiros, 2001; Sun *et al.*, 2007), aunque luego fueron aplicados exitosamente en otras especies tales como *Gossypium* (Lin *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), *Cucumis melo* L. (Wang *et al.*, 2008), *Cynara cardunculus* (Martin *et al.*, 2013), *Pyrus* L. (Zhang *et al.*, 2013), y más recientemente en *Psidium guajava* L. (Padmakar *et al.*, 2015). Los marcadores SRAP fueron utilizados previamente por nuestro grupo de trabajo para realizar un mapa de ligamiento con una población F₂ de arveja derivada del cruzamiento entre las líneas DDR11 y Zav25. Dicha población fue sembrada durante el invierno del año 2012, año en que se produjeron heladas que provocaron pérdidas en el cultivo, quedando conformada la población final tan sólo por 45 individuos. La poca disponibilidad de semilla imposibilitó continuar trabajando con dicha población de mapeo. Sin embargo, el mapa de ligamiento desarrollado permitió determinar la utilidad de los marcadores SRAP para la realización de estudios genéticos en arveja, obteniéndose en promedio 8,32 BP por combinación de cebadores. Con la población obtenida a partir del cruzamiento entre Explorer y DDR14 se evaluó un mayor número de combinaciones y se obtuvo un valor de 6,50 BP por combinación de cebadores. Este valor es similar al observado en otras especies, donde se reportaron entre 3 a 14 BP por combinación de cebadores (Li y Quiros, 2001; Lin *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2013; Padmakar *et al.*, 2015). Esta técnica puede ser utilizada para la construcción de mapas genéticos saturados dado que con una combinación de cebadores es

posible detectar un elevado número de loci polimórficos. Además puede considerarse la posibilidad de combinar estos marcadores con técnicas de secuenciación.

A través del análisis de chi-cuadrado se detectó que el 45,6 % de los marcadores SRAP segregaron de manera distorsionada. El fenómeno de segregación distorsionada ha sido observado en poblaciones de mapeo de distintas especies evaluadas con este tipo de marcadores. Li *et al.* (2007) reportaron que 24 de 31 marcadores SRAP (77 %) mostraron segregación distorsionada en una población de algodón, mientras que Zhang *et al.* (2011) detectaron distorsión en la segregación del 23 % de los marcadores en una población F₂ de crisantemos. Finalmente, Martin *et al.* (2013) reportaron un 24 % de segregación distorsionada en una población de alcauil.

La técnica SRAP está dirigida, principalmente, a la detección de secuencias codificantes del genoma, por lo tanto su combinación con marcadores microsatélites (SSR), los cuales son más abundantes en las regiones no codificantes, contribuye al desarrollo de un mapa de ligamiento que cubra la totalidad del genoma de la especie en estudio. Si bien el desarrollo de marcadores SSR específicos para una especie en particular es costoso e insume mucho tiempo, se han desarrollado varios microsatélites para arveja (Burstin *et al.*, 2001; Lorigon *et al.*, 2005; Tar'an *et al.*, 2005, Sun *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). De los 49 marcadores SSR que inicialmente fueron evaluados, sólo diez amplificaron correctamente y resultaron polimórficos en la población en estudio, sin embargo su incorporación en el mapa nos permitió asignar los GL desarrollados en la presente tesis en relación al mapa consenso desarrollado por Lorigon *et al.* (2005).

A través de ambos sistemas de marcadores se detectó un elevado número de bandas monomórficas entre los progenitores, un 48,2 % de los 948 marcadores SRAP y un 57,1 % de los 28 SSR. Si bien esto podría señalar una baja divergencia genética entre estas variedades, no coincide con lo expresado por Espósito *et al.* (2014), quienes evaluaron 10 SSR y 213 marcadores SRAP en 23 variedades de arveja, que incluían a DDR14 y Explorer, y determinaron que las dos variedades pertenecían a diferentes grupos al realizar un análisis de conglomerados. En la evaluación molecular llevada a cabo en este trabajo de Tesis se han utilizado un mayor número de marcadores SRAP, los cuales, como se mencionó anteriormente están orientados a la detección de secuencias codificantes y, por ende, quizás más conservadas debido al efecto de la

selección natural, disminuyendo así la divergencia entre los progenitores en estos loci específicos.

A fin de generar una cantidad elevada de marcadores SNP en la población para obtener una mayor saturación del mapa se utilizó la técnica GBS, que ha probado ser un método eficiente para el análisis del genoma de diferentes especies, tales como girasol (Celik *et al.*, 2016), trigo (Li *et al.*, 2015b), cebada y maíz (Poland *et al.*, 2012). GBS es una estrategia de secuenciación poco profunda, que permite evaluar muchas muestras en paralelo, diseñada para simplificar la producción de bibliotecas de ADN y minimizar el costo por muestra. Esta cobertura superficial da como resultado un alto número de datos faltantes, errores de genotipado y subclasificación de sitios heterocigóticos (Hyma *et al.*, 2015). Si bien la imputación de los genotipos faltantes es práctica en muestras homocigóticas con haplotipos conocidos y orden de secuencia, es propensa a generar errores, más aún para aquellas especies que carecen de un genoma de referencia, como es el caso de la arveja. La presencia de un alto número de copias de secuencias repetidas dispersas en el genoma de la arveja también generan complicaciones, dado que la presencia de ADN repetitivo hace que una única alineación de lecturas de secuencias sea difícil o imposible (Treangen y Salzberg, 2013). A pesar de las dificultades, la técnica ha sido utilizada recientemente en arveja en estudios de diversidad genética (Holdsworth *et al.*, 2015) y de mapeo (Ma *et al.*, 2015) y también ha sido utilizada en poblaciones F₂ de palma (Pootakham *et al.*, 2015) y *Arabidopsis thaliana* (Rowan *et al.*, 2015) para la detección de QTLs. Dado que en nuestro estudio se obtuvo un porcentaje muy alto de datos perdidos, se decidió eliminar del análisis aquellos marcadores e individuos con más de 50 % de datos faltantes a fin de minimizar errores. Por otro lado, se observó distorsión en estos marcadores provocada por el bajo número de sitios heterocigotas detectados. Un bajo número de individuos en estado heterocigota implica un menor número de eventos de recombinación que los esperados, y por lo tanto la longitud del mapa se ve reducida. Una consecuencia de esto es la observación de mas GLs no recombinantes de lo esperado (Knox y Ellis, 2002).

Para la construcción del mapa de ligamiento con los marcadores SSR, SRAP y SNP se utilizaron inicialmente aquellos marcadores que presentaron segregación mendeliana. Luego se incluyeron los marcadores que presentaron una desviación de dicha segregación sólo si su presencia no alteraba el orden local de los marcadores previamente incluidos. Esta estrategia de desarrollo del

mapa de ligamiento nos permitió aumentar la cobertura final del mapa, sin perder la precisión del mismo. Estrategias similares de mapeo han sido utilizadas en diferentes especies, tales como: oliva (Khadari *et al.*, 2010), alcaucil y cardo (Martin *et al.*, 2013), lenteja (Verma *et al.*, 2015), álamo (Zhou *et al.*, 2015), y trigo (Li *et al.*, 2015a).

Existe una larga historia de estudios de mapeo en arveja (Tabla 1 y Tabla 2) utilizando diversos tipos de marcadores. El primer mapa consenso para la especie fue desarrollado por Weeden *et al.* (1998), a partir de marcadores desarrollados en una población de 51 RIL, que fueron combinados con otros marcadores de posición conocida que no segregaron en la población generada. El mapa abarcó una longitud de 800 cM, cercana a lo esperado de acuerdo a la distribución del quiasma en el genoma de la arveja (Hall *et al.*, 1997). El mapa genético más citado y utilizado de la especie hasta el momento, fue generado a partir de tres poblaciones RIL con 239 marcadores SSR y 1.430 cM mapeados (Loridon *et al.*, 2005). Los marcadores en dicho mapa se encuentran uniformemente distribuidos a través de siete GL, con un 85 % de intervalos entre marcadores menores a 10 cM. Posteriormente, se desarrolló un mapa consenso que incluyó 214 marcadores funcionales, los cuales representan genes de diversas clases, tales como genes de desarrollo, de metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, de transporte y de regulación transcripcional (Bordat *et al.*, 2011). El mapa también incluye 180 SSR, 133 RAPD y tres marcadores morfológicos, a través de los cuales puede ser relacionado con otros mapas publicados. El último mapa consenso desarrollado para la especie se realizó utilizando técnicas de secuenciación de última generación. Se analizaron 12 poblaciones RIL a partir de las cuales se obtuvo un mapa de 749,9 cM con 15.079 marcadores y una distancia media entre marcadores de 0,24 cM (Tayeh *et al.*, 2015a). El mapa desarrollado en este trabajo de tesis incluyó 134 marcadores distribuidos en nueve GLs, cubriendo una distancia total de 655,495 cM. La distancia promedio entre marcadores fue de 4,89 cM, con un 94,9 % de marcadores separados por distancias menores a 10 cM. Comparando los diferentes mapas se detectan variaciones de longitud o discrepancias en el orden de los marcadores entre las distintas poblaciones. Estas diferencias en la longitud de los mapas podrían ser originadas por los errores que ocurren debido a la metilación del ADN o al exceso o deficiencia de heterocigotas (Knox y Ellis, 2002). También pueden estar originadas por diferentes tasas de recombinación, de acuerdo a la divergencia entre los parentales utilizados para los cruzamientos. Un menor grado de divergencia entre los parentales puede traducirse en un

mayor número de regiones homocigotas y en un menor número de recombinantes, donde resulta imposible incorporar marcadores. Las discrepancias en el orden de los marcadores también podrían deberse a translocaciones en las poblaciones utilizadas o a los datos perdidos que pueden haber ocurrido en los marcadores genotipados en las distintas poblaciones. Pese al tamaño inferior de nuestro mapa, el mismo permitió la incorporación de tres tipos de marcadores distintos, los cuales, como se mencionara anteriormente, están orientados a distintas regiones del genoma; los marcadores SRAP están dirigidos a secuencias codificantes, los SSR amplifican en mayor medida regiones no codificantes, mientras que los SNP se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma. Por otro lado, se observó un alto número de marcadores con segregación mendeliana que no presentaron ligamiento con ningún otro marcador (114), lo que refleja la necesidad de enriquecer el mapa con marcadores adicionales para cubrir el genoma completo. No obstante, los valores de cobertura del mapa son comparables a otros mapas publicados que han sido utilizados para la detección de QTLs asociados a diversos caracteres. Dirlenwarger *et al.* (1994) construyeron un mapa parcial de arveja cubriendo 550 cM, con 69 marcadores RFLP y RAPD distribuidos en 12 GL. Dicho mapa fue utilizado para detectar QTLs relacionados a número de nodos y precocidad que explicaron un alto porcentaje de la variación fenotípica. Rai *et al.* (2011) desarrollaron un mapa con 57 marcadores distribuidos en siete GL, cubriendo una distancia de 634 cM y con intervalos promedio de 11,3 cM. Este mapa incluyó un 10 % de marcadores distorsionados que no afectaron el análisis de ligamiento. Detectaron QTLs asociados a la resistencia contra la roya que resultaron consistentes en cuatro ambientes de evaluación. Ubayasena *et al.* (2011) utilizaron 223 marcadores SSR y AFLP para desarrollar un mapa con una cobertura de 450 cM y una distancia promedio entre marcadores de 2 cM. Identificaron 11 GL, de los cuales nueve pudieron relacionarse a seis GL del genoma de arveja a partir de SSR previamente mapeados en el mapa consenso desarrollado por Loridon *et al.* (2005). A pesar de la baja cobertura del genoma pudieron detectar 11 QTLs asociados al color de la semilla. Recientemente, Shunmugan *et al.* (2015) generaron un mapa de ligamiento de 437,2 cM de longitud, utilizando 367 marcadores SNP y detectaron QTLs asociados a la biodisponibilidad del hierro y a la concentración de ácido fítico. Si bien con estos mapas de ligamiento no se llegó a abarcar el genoma completo de la arveja y, en algunos casos, las distancias promedio entre marcadores superaron los 10 cM, todos ellos resultaron efectivos para la detección de QTLs

relacionados a caracteres de interés. El presente mapa, desarrollado con los marcadores SSR, SRAP y SNP, posee una cobertura similar a la de dichos mapas y un escaso número de intervalos entre marcadores superiores a 10 cM, adecuado para la localización de loci de interés.

Para el análisis de QTL se utilizaron los valores genotípicos de los individuos F_2 evaluados a partir de sus progenies $F_{2:3}$. De acuerdo a Zhang y Xu (2004) si el tamaño de la familia $F_{2:3}$ es lo suficientemente grande el valor promedio de la familia representará el valor genotípico de la planta F_2 . Estos autores llevaron a cabo estudios de simulación y establecieron que evaluando 100 familias $F_{2:3}$ con 20 individuos se obtienen resultados confiables. Sin embargo, los estudios que aplican este tipo de diseño para la detección de QTLs han utilizado un número variable de individuos. Leon *et al.* (2003) evaluaron la concentración de aceite en la semilla de girasol analizando diez plantas de 235 familias $F_{2:3}$ en tres ambientes, mientras que Paterson *et al.* (2003) detectaron QTLs relacionados a la calidad de la fibra de algodón evaluando tres repeticiones de cinco plantas en 214 familias. Wang y Xiang (2013) evaluaron caracteres morfológicos y productivos en calabaza utilizando 144 familias con dos repeticiones de seis plantas en tres ambientes y Guan *et al.* (2011) estudiaron caracteres relacionados a la producción de energía tomando los datos de dos repeticiones de cinco plantas provenientes de 186 familias. En el presente trabajo se evaluaron 110 familias $F_{2:3}$ con dos repeticiones de diez plantas en los dos ambientes en evaluación, lo que generó un total de 4400 plantas evaluadas.

La localización de los QTLs se llevó a cabo por el método CIM, con un valor umbral de $LOD=2,5$, que de acuerdo a Tanksley (1993) permite detectar QTLs menores. Timmerman-Vaughan *et al.* (1996) e Irzykowska y Wolko (2004) utilizaron un valor umbral de $LOD=2$ en estudios de mapeo de QTL para caracteres relacionados a rendimiento en arveja. En dicho trabajo, Timmerman-Vaughan *et al.* (1996), evaluaron el carácter PS utilizando una progenie de 102 individuos F_2 y 51 RILs provenientes de diferentes cruzamientos. Los mapas de ligamiento generados a partir de las dos poblaciones abarcaron regiones mayores a 1.000 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 7,59 y 6,44 cM. En la población F_2 se detectaron tres QTLs por mapeo por intervalo simple, mientras que en la población RIL se detectaron siete QTLs por análisis simple. Sólo una región genómica correspondiente al GL 3 fue identificada en ambas cruza. Irzykowska y Wolko (2004) construyeron un mapa de ligamiento a partir de 114 plantas F_2 con 204 marcadores que abarcó 2.416 cM y que fue utilizado para detectar QTLs relacionados

a NV, NS y PS. Los caracteres fueron medidos en las plantas F_2 y en las familias F_4 derivadas a partir de la misma cruce. A través de mapeo por intervalo simple se detectaron 22 QTLs en las dos poblaciones que explicaron entre 10 y 55 % de la variancia fenotípica. Una región del GL 7 se asoció a NS en las dos poblaciones estudiadas.

En comparación con otros cultivos económicamente importantes se han reportado pocos estudios de caracteres cuantitativos relacionados al rendimiento en arveja y los avances al respecto son aún muy limitados (Smykal *et al.*, 2012). Tar'an *et al.* (2003) evaluaron AP en 11 ambientes en una población RIL de 88 individuos utilizando un mapa de 1.274 cM y 207 marcadores. Detectaron tres QTLs, que explicaron en conjunto 64 % de la variancia fenotípica observada. Uno de los QTLs se manifestó en los 11 ambientes evaluados, mientras que los otros dos sólo lo hicieron en dos o tres ambientes. Timmerman-Vaughan *et al.* (2004) desarrollaron un mapa con 108 marcadores distribuidos en 1.396 cM a partir de 227 individuos F_2 y analizaron asociaciones con los caracteres NS y PS en tres ambientes distintos. Detectaron nueve QTLs relacionados a cada carácter, que explicaron entre 3 y 27 % de la variancia fenotípica. Tres QTLs relacionados a NS y cuatro relacionados a PS fueron detectados en los tres ambientes. Krajewski *et al.* (2012) estudiaron PS y NS evaluando dos poblaciones RIL en tres ambientes, utilizando mapas de ligamiento de 853 y 1.086 cM, con 91 y 191 marcadores. Se detectó un QTL para NS que resultó consistente en las dos poblaciones y los tres ambientes y cuatro QTLs para PS, que fueron consistentes en más de un ambiente, pero no entre las poblaciones. Klein *et al.* (2014) utilizaron un mapa de 679 marcadores SNP distribuidos en siete GL abarcando 947,1 cM para detectar QTLs relacionados a NV, NS, SV y PS. Evaluaron seis ambientes y encontraron dos QTLs consistentes en más de un ambiente en el GL 3 para NS, un QTL consistente para SV en el GL 7 y dos QTLs consistentes para PS en los GL 1 y GL 3. La ausencia de marcadores comunes con todos estos mapas no nos permite relacionar estos QTLs con los encontrados en el presente trabajo. Sin embargo, Burstin *et al.* (2007) y Bourion *et al.* (2010) realizaron análisis de QTLs con mapas de ligamiento que incluyeron algunos de los SSR incluidos en este trabajo. Burstin *et al.* (2007) detectaron 22 QTLs relacionados a PS, de los cuales siete fueron consistentes en al menos dos ambientes. El intervalo de confianza de un QTL situado en el GL 1 incluyó al marcador D21 y el del QTL situado en el GL 3 incluyó a AA355. En nuestra población no detectamos QTLs asociados a PS en las regiones cercanas a D21, pero si se detectó un QTL

cercano a AA355 en la población F₂. Para AP sólo detectaron un QTL consistente en los cinco ambientes evaluados, situado en el GL 3. Para NS detectaron nueve QTLs, de los cuales tres fueron consistentes. El intervalo de confianza de un QTL situado en el GL 7 incluyó al SSR AD56, sin embargo, dicho QTL no fue detectado en nuestra población. Bourion *et al.* (2010) encontraron un QTL consistente en dos años para NS en el GL 1 cuyo intervalo de confianza incluyó al marcador D21, que no fue detectado en este caso. Para PS se detectaron nueve QTLs, de los cuales tres fueron consistentes en dos ambientes. Nuevamente se detectó el QTL en el GL 3 en la región del genoma que incluye a AA355.

Al realizar el análisis CIM con nuestra población de mapeo se detectaron 49 QTLs en las distintas generaciones y ambientes estudiados. En general un QTL individual puede ser definido como mayor o menor en función al porcentaje de variación fenotípica que explica (R^2), considerándose QTLs mayores a aquellos que explican porcentajes de variación mayores al 10 % (Collard *et al.* 2005). Por tanto, todos los QTLs encontrados en el presente trabajo pueden considerarse QTLs mayores ya que explican porcentajes superiores a 12,6 %. Algunos QTLs presentaron grandes intervalos de confianza (superiores a 5 cM), pero se estimó la posición de los QTLs a partir del punto de máxima significancia estadística del pico y se detectaron los marcadores asociados a los mismos. Para 23 QTLs la distancia al marcador más cercano fue menor a 1 cM, consistiendo estos marcadores en dos SSR, dos SNP y 19 SRAP. Es importante destacar al marcador Me10-Em8.175 que está ubicado a 0,120 cM de df4 (F_{2:3}, 2015), ns4 y nv4 (F₂, 2013) y a 0,880 cM de av5 (F_{2:3}, 2015). Otro marcador que se situó cerca de más de un QTL fue Me8-Em7.666, ubicado a 0,220 cM de df1 y a 0,780 cM de nv1, ambos detectados en la población F₂. Para el resto de los QTLs la distancia varió entre 1 y 11 cM. La disponibilidad de marcadores asociados a los caracteres de interés resulta de gran utilidad, ya que podrían ser incorporados al programa de mejoramiento de la especie. Del total de QTLs detectados en este trabajo, merecen mayor atención los que fueron detectados en al menos dos generaciones y/o años, relacionados a los caracteres AP, AV y NV. Las regiones de interés se ubican en el GL 3 y en el GL 1. Considerando el conjunto de QTLs detectados para los distintos ambientes y poblaciones se observaron regiones donde co-localizaron QTLs relacionados a distintos caracteres en el GL 1, GL 3, GL 7, GL NA1 y GL NA2. La resolución genética proporcionada por este experimento no nos permite distinguir entre pleiotropía o genes separados pero

estrechamente ligados. Para determinar si los QTL corresponden a un único o a varios genes se necesita una población de mapeo más numerosa y un mayor número de marcadores con menor espaciado entre los mismos. Co-localizaciones de QTLs para los diferentes caracteres relacionados al rendimiento han sido observadas en numerosos estudios (Irzykowska y Wolko, 2004; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005; Burstin *et al.*, 2007; Bourion *et al.*, 2010). Estas regiones proporcionan información muy útil para el análisis de genes candidatos y la selección asistida por marcadores, ya que estos intervalos podrían considerarse como “*hotspots*” con importancia agronómica.

Al realizar el análisis de QTL con aquellos marcadores con segregación mendeliana que no formaron parte del mapa se observó un alto número de asociaciones con los caracteres estudiados que resultaron consistentes entre las distintas campañas. Esto nos muestra que dentro de las regiones del genoma que no fueron cubiertas por el mapa desarrollado hay QTLs involucrados en el control de los caracteres productivos de arveja. Dichas regiones podrían ser incluidas en el mapa mediante la incorporación de nuevos marcadores moleculares.

Los resultados obtenidos en el análisis de QTL permiten explicar muchos de los resultados observados a nivel fenotípico. La correlación mostrada entre algunos caracteres se pone de manifiesto en la detección de QTLs comunes para los mismos. Se observaron correspondencias entre los QTLs detectados para NS y NV tanto en la población F_2 como en la $F_{2:3}$ en el 2015, en los GL 1, GL NA1 y GL NA2, lo cual estaría de acuerdo con la fuerte correlación encontrada entre ambos caracteres en las poblaciones $F_{2:3}$. En todos los casos los efectos aditivos de los QTLs presentaron el mismo signo, es decir que el alelo del mismo padre incrementa los valores de ambos caracteres, lo cual es acorde a la correlación positiva encontrada entre ellos. También los QTLs ps5 y df5 presentaron intervalos de confianza superpuestos durante el año 2015, donde DDR14 aporta el alelo que aumenta los valores del carácter PS y Explorer hace lo propio para el carácter DF, lo que podría explicar la correlación negativa (-77,5 %) encontrada para estos caracteres. De igual manera, la asociación entre ap2 y sv3 (GL 3) en el año 2014 con efectos aditivos de signo opuesto podría explicar en parte la correlación observada entre dichos caracteres (-54,8 %).

Debido a la presencia de QTLs con efectos aditivos de valores opuestos se espera que se produzcan segregantes transgresivos en la población debido a la acción complementaria de los

genes de los dos parentales (DeVicente y Tanksley, 1993). A través de las distintas campañas evaluadas se encontraron QTLs con efectos aditivos de distinto signo para todos los caracteres, excepto AV, lo cual concuerda con la presencia de segregantes transgresivos. Si se consideran los resultados obtenidos para cada año, sólo se pueden analizar los caracteres para los que se detectaron múltiples QTLs. En la población F_2 sólo se observan efectos aditivos de distinto signo para NS, que no se tradujeron en la presencia de segregantes transgresivos en dicha población. En la población $F_{2:3}$ evaluada en el 2014 se observaron QTLs con efectos aditivos de distinto signo para AP y NV, para los cuales se observaron 2,7 y 10,9 % de familias transgresivas. Por último, en la población $F_{2:3}$ evaluada en el 2015 DS presentó QTLs con efectos opuestos y se observó un 25 % de familias transgresivas, en cambio para LV la presencia de dos QTLs con efectos opuestos no se correlacionó con la presencia de familias transgresivas.

Los elevados valores de heredabilidad obtenidos indican que las variaciones observadas dentro de la progenie son controladas en su mayoría genéticamente. Sin embargo, los QTLs detectados en conjunto explicaron de 12,6 a 50,9 % de la variación fenotípica en los caracteres estudiados, lo que sugiere que parte de la variación genética no está explicada por estos QTLs. En este análisis no han podido ser detectados QTLs con bajos efectos individuales. Además, el tamaño de la población utilizada puede haber generado sesgos en los cálculos de los efectos de los QTLs y de las proporciones de la varianza genotípica explicada por los mismos (Utz *et al.*, 2000).

Los estudios desarrollados en esta tesis constituyen un primer paso para el estudio de la herencia de caracteres productivos en arveja. A partir del análisis de los datos surge la necesidad de incorporar nuevos marcadores en el mapa de ligamiento que nos permitan detectar nuevas regiones del genoma implicadas en el control de los caracteres, además de poder acotar las regiones ya detectadas. Los QTLs que se observaron con los datos disponibles proporcionan una imagen de la complejidad genética de los caracteres bajo estudio y constituyen una fuente de información importante para el análisis genético y el mejoramiento de la especie. Los marcadores detectados podrían ser utilizados para selección asistida por marcadores, especialmente aquellos situados a distancia menores a 1 cM (Mohan *et al.*, 1997). Sin embargo, dichas regiones, tendrán que ser acotadas mediante la incorporación de un mayor número de marcadores moleculares, con el fin de identificar el marcador que maximice la predicción de la variación fenotípica, con el objeto de poder ser usado en los programas de mejora genética.

Por otro lado, los marcadores SRAP, podrían ser secuenciados para luego ser comparados con las bases de datos de la legumbre modelo *Medicago Truncatula*, a fin de identificar genes candidatos relacionados con el carácter. Dado que estos marcadores están orientados a regiones codificantes es muy probable que se localicen en regiones génicas. Sun *et al.* (2007) observaron, mediante análisis BLAST, que las secuencias de aproximadamente un 50 % de los marcadores SRAP incluidos en el mapa de ligamiento desarrollado para *Brassica napus* eran similares a genes reportados en *Arabidopsis*. En cuanto a los marcadores SNP, será necesario realizar nuevos análisis sobre las muestras que presentaron una mayor cantidad de datos faltantes para poder aprovechar al máximo la información generada a partir de la técnica GBS. Estas secuencias podrán ser fácilmente examinadas de nuevo para ser integradas con datos más completos de la secuencia genómica de la arveja conforme estén disponibles.

10. CONCLUSIONES

- A partir del cruzamiento entre las variedades Explorer y DDR14 fue posible generar variabilidad para diferentes caracteres relacionados con el rendimiento en arveja.
- Se observó segregación transgresiva y variación continua en la progenie para los caracteres evaluados, de acuerdo con la herencia poligénica de los mismos.
- Se obtuvieron valores elevados de heredabilidad en sentido estricto para los caracteres en estudio, que indican que se podría obtener una ganancia genética rápida a través de la selección para los distintos caracteres.
- Se observó una correlación alta y positiva entre los caracteres número de vaina y número de semilla y también entre longitud y ancho de vaina. Por otro lado, se observó una correlación positiva pero débil de la altura de la planta con el peso de las semillas, y una correlación débil y negativa de los días a floración con el ancho y diámetro de la vaina.
- Los marcadores SRAP resultaron eficientes para la realización de estudios genéticos en arveja, hallándose 261 marcadores polimórficos con segregación mendeliana (ó ligeramente distorsionada) en la población F₂ generada.
- Sólo 28 marcadores SSR pudieron ser amplificados en la población estudiada, de los cuales diez resultaron polimórficos entre los parentales Explorer y DDR14.
- Los marcadores SNP desarrollados a través de la técnica GBS no resultaron óptimos para el desarrollo de estudios de mapeo en la población de arveja estudiada, obteniéndose 2.994 marcadores con 69,6 % de datos perdidos.
- Se desarrolló un mapa de ligamiento preliminar, utilizando 134 marcadores, distribuidos en siete grupos de ligamiento, cubriendo una distancia de 655,495 cM.
- Se encontraron QTLs que explican un alto porcentaje de la variabilidad observada para los caracteres estudiados.
- Tres QTLs relacionados a AP, AV y NV resultaron consistentes en las distintas poblaciones y ambientes estudiados, además se encontró un QTL relacionado a PS que ya había sido observado por otros autores. Las regiones involucradas en el control de estos caracteres resultan de interés y deberán ser estudiadas con mayor profundidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, H. M. (2001). *Enciclopedia Agropecuaria Terranova: Producción Agrícola I*. Bogotá.
- Almirón, P. (2015) Estimación de la variabilidad presente en materiales de arveja (*Pisum sativum* L.) para racionalizar su uso y conservación mediante la creación de una Colección núcleo. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.R.
- Amin, A., Mushtaq, F., Singh, P., Wani, K., Spaldon, S. & Nazir, N. (2010). Genetics and breeding of pea. *International Journal of Current Research* **10**, 28-34.
- Annor, G. A., Ma, Z. & Boye, J. I. (2014). Crops – Legumes. *Food Processing: Principles and Applications*, 305-337.
- Aryamanesh, N., Zeng, Y., Byrne, O., Hardie, D. C., Al-Subhi, A. M., Khan, T., Siddique, K. H. & Yan, G. (2014). Identification of genome regions controlling cotyledon, pod wall/seed coat and pod wall resistance to pea weevil through QTL mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 489-497.
- Aubert, G., Morin, J., Jacquin, F., Loridon, K., Quillet, M.C., Petit, A., Rameau, C., Lejeune-Hénaut, I., Huguet, T. & Burstin, J. (2006). Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 1024-1041.
- Avci, M. A. & Ceyhan, E. (2006). Correlations and Genetic Analysis of Pod Characteristics in Pea (*Pisum Sativum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences* **5**, 1-4.
- Badigannavar, A. & Myers, G.O. (2015) Construction of Genetic Linkage Map and QTL Analysis for Fiber Traits in Diploid Cotton (*Gossypium arboreum* x *Gossypium herbaceum*). *The Journal of Cotton Science* **19**, 15–26.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A. & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* **3**, 1-7.
- Balzarini, M. & Di Renzo, J. (2003). *Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos*. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

- Baranger, A., Aubert, G., Arnau, G., Lainé, A.L., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Lejeune-Hénaut, I., Lallemand, J. & Burstin, J. (2004). Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 1309-1321.
- Barilli, E., Satovic, Z., Rubiales, D. & Torres, A. M. (2010). Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross. *Euphytica* **175**, 151-159.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **196**, 80-83.
- Bermejo, C., Cravero, V., Anido, F. & Cointy, E. (2010). Agronomic and molecular evaluation of recombinant inbred lines (RILs) of lentil. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **2**, 280-285.
- Bi, Y., Li, W., Xiao, J., Lin, H., Liu, M., Liu, M., Luan, X., Zhang, B., Xie, X., Guo, D. & Lai, Y. (2015). Heterosis and combining ability estimates in isoflavone content using different parental soybean accessions: Wild soybean, a valuable germplasm for soybean breeding. *PLoS ONE* **10**, 1-13.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120.
- Bordat, A., Savoie, V., Nicolas, M., Salse, J., Chauveau, A., Bourgeois, M., Potier, J., Houtin, H., Rond, C., Murat, F. & Marget, P. (2011). Translational Genomics in Legumes Allowed Placing In Silico 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. *G3: Genes, Genome, Genetics* **1**, 93-103.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* **32**, 314-31.
- Bourgeois, M., Jacquin, F., Cassecuelle, F., Savoie, V., Belghazi, M., Aubert, G., Quillien, L., Huart, M., Marget, P. & Burstin, J. (2011). A PQL (protein quantity loci) analysis of mature pea seed proteins identifies loci determining seed protein composition. *Proteomics* **11**, 1581-1594.
- Bourion, V., Rizvi, S. M. H., Fournier, S., de Larambergue, H., Galmiche, F., Marget, P., Duc, G. & Burstin, J. (2010). Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach

- of root, nodule, and shoot variability. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 71-86.
- Boutet, G., Carvalho, S.A., Falque, M., Peterlongo, P., Lhuillier, E., Bouchez, O., Lavaud, C., Pilet-Nayel, M.L., Rivière, N. & Baranger, A. (2016). SNP discovery and genetic mapping using genotyping by sequencing of whole genome genomic DNA from a pea RIL population. *BMC Genomics* **17**, 121-136.
- Brandan, E. Z. & Ploper, J. (1999). *El cultivo de la arveja (Pisum Sativum L.)*. Ediciones del Rectorado U.N.T. Tucumán.
- Broman, K. W. (2001). Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab Animal* **30**, 44-52.
- Burstin, J., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Aubert, G. & Baranger, A. (2001). Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding* **120**, 311-317.
- Burstin, J., Marget, P., Huart, M., Moessner, A., Mangin, B., Duchene, C., Desprez, B., Munier-Jolain, N. & Duc, G. (2007). Developmental Genes Have Pleiotropic Effects on Plant Morphology and Source Capacity, Eventually Impacting on Seed Protein Content and Productivity in Pea. *Plant Physiology* **144**, 768-781.
- Cahaner, A. & Hillel, J. (1980). Estimating heritability and genetic correlation between traits from generations F₂ and F₃ of self-fertilizing species: a comparison of three methods. *Theoretical and Applied Genetics* **58**, 33-38.
- Celik, I., Bodur, S., Frary, A. & Doganlar, S. (2016). Genome-wide SNP discovery and genetic linkage map construction in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a genotyping by sequencing (GBS) approach. *Molecular Breeding* **36**, 1-9.
- Ceyhan, E., Harmanakaya, M. & Kahraman, A. (2014). Combining ability and heterosis for concentration of mineral elements and protein in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **38**, 581-590.
- Chew, P., Meade, K., Hayes, A., Harjes, C., Bao, Y., Beattie, A. D., Puddephat, I., Gusmini, G. & Tanksley, S. D. (2016). A study on the genetic relationships of Avena taxa and the origins of hexaploid oat. *Theoretical and Applied Genetics* **129**, 1-11.
- 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**, 169-196.

- Connor, A. M., Stephens, M. J., Hall, H. K. & Alspach, P. A. (2005). Variation and Heritabilities of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content Estimated from a Red Raspberry Factorial Experiment. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**, 403-411.
- Cravero, V., Martin, E. & Cointry, E. (2007). Genetic diversity in *Cynara cardunculus* determined by sequence-related amplified polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 208-212.
- Cruz, C. D. (2001). *Programa GENES - versão windows. Aplicativo computacional em Genética e Estatística*. Editorial UFV. Viçosa.
- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *The British Journal of Nutrition* **108**, S3-S10.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M. & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Review Genetics* **12**, 499-510.
- De Bernardi, L. (2016). Informe de Arvejas (*Pisum Sativum*). *Subsecretaría de Mercados Agropecuarios*.
- Deulvot, C., Charrel, H., Marty, A., Jacquin, F., Donnadieu, C., Lejeune-Hénaut, I., Burstin, J. & Aubert, G. (2010). Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics* **11**, 468-478.
- DeVicente, M. C. & Tanksley, S. D. (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics* **134**, 585-596.
- Ding, J. Q., Ma, J. L., Zhang, C. R., Dong, H. F., Xi, Z. Y., Xia, Z. L. & Wu, J. Y. (2011). QTL mapping for test weight by using F_{2:3} population in maize. *Journal of Genetics* **90**, 75-80.
- Dirlewanger, E., Isaac, P. G., Ranade, S., Belajouza, M., Cousin, R. & de Vienne, D. (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **88**, 17-27.
- Dixon, R. A. & Sumner, L. W. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology* **131**, 878-885.

- Doerge, R. W. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews. Genetics* **3**, 43-52.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 149-151.
- Duarte, J., Rivière, N., Baranger, A., Aubert, G., Burstin, J., Cornet, L., Lavaud, C., Lejeune-Hénaut, I., Martinant, J.P., Pichon, J.P. & Pilet-Nayel, M.L. (2014). Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in Pea. *BMC Genomics* **15**, 126-141.
- Duc, G., Agrama, H., Bao, S., Berger, J., Bourion, V., De Ron, A.M., Gowda, C.L., Mikic, A., Millot, D., Singh, K.B. & Tullu, A. (2014). Breeding Annual Grain Legumes for Sustainable Agriculture: New Methods to Approach Complex Traits and Target New Cultivar Ideotypes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 381-411.
- Dumont, E., Fontaine, V., Vuylsteker, C., Sellier, H., Bodèle, S., Voedts, N., Devaux, R., Frise, M., Avia, K., Hilbert, J.L. & Bahrman, N. (2009). Association of sugar content QTL and PQL with physiological traits relevant to frost damage resistance in pea under field and controlled conditions. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1561-1571.
- Ellis, T. H. N. & Poyser, S. J. (2002). An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist* **153**, 17-25.
- Ellis, T. H. N., Turner, L., Hellens, R. P., Lee, D., Harker, C. L., Enard, C., Domoney, C. & Davies, D. R. (1992). Linkage maps in pea. *Genetics* **130**, 649-663.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S. & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* **6**, 1-10.
- Espósito, A., Milanesi, L., Martin, E., Cravero, V., Lopez Anido, F. & Cointry, E. (2007). Analysis Based on Morphological , Protein and SRAP Markers in Pea (*Pisum sativum* L). *International Journal of Plant Breeding* **1**, 129-134.
- Espósito, M. A., Martin, E. A., Cravero, V. P., Liberatti, D., López Anido, F. S. & Cointry, E. L. (2009). Relationships among agronomic traits and seed yield in pea. *Journal of Basic and Applied Genetics* **20**, 1-8.
- Espósito, M. A., Bermejo, C., Gatti, I., Guindón, M. F., Cravero, V. & Cointry, E. L. (2014). Prediction of heterotic crosses for yield in *Pisum sativum* L. *Scientia Horticulturae* **177**, 53-

62.

- Falconer, D. S. (1960). *Introduction to Quantitative Genetics*. Londres.
- FAO (2014). The Statistics Division of the FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- FAO (2015). *Food Outlook. Biannual Report on global Food Markets*.
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Conner, R. L., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., McLaren, D. L. & Xue, A. G. (2011). Identification of microsatellite markers linked to quantitative trait loci controlling resistance to *Fusarium* root rot in field pea. *Canadian Journal of Plant Science* **91**, 199-204.
- Ferreira, A., da Silva, M. F., da Costa e Silva, L. & Cruz, C. D. (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 187-192.
- Fikreselassie, M. (2012). Variability, heritability and association of some morpho-agronomic traits in field pea (*Pisum sativum* L.) genotypes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **15**, 358-366.
- Fondevilla, S., Martín-Sanz, A., Satovic, Z., Fernández-Romero, M. D., Rubiales, D. & Caminero, C. (2012). Identification of quantitative trait loci involved in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* **186**, 805-812.
- Fu, Y. B., Cheng, B. & Peterson, G. W. (2014). Genetic diversity analysis of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) germplasm based on genotyping by sequencing. *Genetic Resources and Crop Evolution* **61**, 579-594.
- Furuta, T., Ashikary, M., Jena, K., Doi, K. & Reuscher, S. (2017). Adapting genotyping-by-sequencing for rice F₂ populations. *G3: Genes, Genome, Genetics*.
- Gatti, I., Espósito, M. A., Almirón, P., Cravero, V. P. & Cointry, E. L. (2011). Diversity of pea (*Pisum sativum*) accessions based on morphological data for sustainable field pea breeding in Argentina. *Genetics and Molecular Research* **10**, 3403-3410.
- Gent, G. P. (1988). *Pea Growing Handbook*. Peterborough.
- Georgieva, N., Nikolova, I. & Kosev, V. (2015). Association study of yield and its components in pea (*Pisum Sativum* L.). *International Journal of Pharmacognosiy* **2**, 536-542.
- Georgieva, N., Nikolova, I. & Kosev, V. (2016). Evaluation of genetic divergence heritability in

- pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Bioscience and Biotechnology* **5**, 61-67.
- Goldenberg, F. B. (1965). Afil, A New Mutation in Pea. *Boletín de Genética*. Instituto de Fitotecnia. Castelar, Argentina. 27-28.
- Gomez, G. E. & Ligarreto, G. A. (2012). Analysis of genetic effects of major genes on yield traits of a pea (*Pisum sativum* L.) cross between the Santa Isabel x WSU 31 varieties. *Agronomía Colombiana* **30**, 317-325.
- Govorov, L. I. (1937). Peas. *Cultivated Flora of the USSR*, 231-336.
- Graham, P. H. & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* **131**, 872-877.
- Guan, Y., Wang, H., Qin, L., Zhang, H., Yang, Y., Gao, F., Li, R. & Wang, H. (2011). QTL mapping of bio-energy related traits in Sorghum. *Euphytica* **182**, 431-440.
- Guindon, M. F., Martin, E., Zayas, A., Cointry, E. & Cravero, V. (2016). Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **16**, 182-188.
- Gupta, P. K., Rustgi, S. & Mir, R. R. (2008). Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity* **101**, 5-18.
- Gürçan, K., Teber, S., Ercisli, S. & Yilmaz, K. U. (2016). Genotyping by Sequencing (GBS) in Apricots and Genetic Diversity Assessment with GBS-Derived Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs). *Biochemical Genetics* **54**, 854-885.
- Haider, A. S., Fouad, W. M., Soliman, M. A. & Badawi, M. A. (2013). Variability of morphological characters, protein patterns and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in some *Pisum* genotypes. *African Journal of Agricultural Research* **8**, 1608-1616.
- Haley, C. S. & Knott, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**, 315-24.
- Hall, K. J., Parker, J.S., Ellis, T.H.N., Turner, L., Knox, M.R., Hofer, J.M.I., Lu, J., Ferrandiz, C., Hunter, P.J., Taylor, J.D. & Baird, K. (1997). The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. II. Physical maps of linkage mapping populations. *Genome* **40**, 755-69.
- Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C.J., McGee, R.J., Le Goff, I., L'Anthoëne, V., Esnault, R., Riviere, J.P., Klein, A., Mangin, P. & McPhee, K.E. (2011). New consistent QTL in pea

- associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 261-281.
- Hamon, C., Coyne, C.J., McGee, R.J., Lesné, A., Esnault, R., Mangin, P., Hervé, M., Le Goff, I., Deniot, G., Roux-Duparque, M. & Morin, G. (2013). QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biology* **13**, 45-64.
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z. X., Liu, H. & Li, Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science* **5**, 484-492.
- Holdsworth, W., Ma, Y., Cheng, P., McGee, R. J., Coyne, C. J., Gore, M. & Mazourek, M. (2015). Genotyping by sequencing reveals the genetic diversity of the USDA *pisum* diversity collection. *Plant and Animal Genome Conference*.
- Huang, X.-Q., Huang, T., Hou, G.-Z., Li, L., Hou, Y. & Lu, Y.-H. (2016). Identification of QTLs for seed quality traits in rapeseed (*Brassica napus* L.) using recombinant inbred lines (RILs). *Euphytica* **210**, 1-16.
- Hunter, P. J., Ellis, N. & Taylor, J. D. (2001). Association of dominant loci for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* with linkage groups II, VI and VII of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 129-135.
- Hyma, K. E., Barba, P., Wang, M., Londo, J. P., Acharya, C. B., Mitchell, S. E., Sun, Q., Reisch, B. & Cadle-Davidson, L. (2015). Heterozygous mapping strategy (HetMappS) for high resolution genotyping-by-sequencing markers: A case study in grapevine. *PLoS ONE* **10**, 1-31.
- Irzykowska, L. & Wolko, B. (2004). Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in *Pisum sativum*. *Journal of Applied Genetics* **45**, 297-306.
- Irzykowska, L., Wolko, B. & Swiecicki, W. (2002). Interval mapping of QTLs controlling some morphological traits in pea. *Cellular & Molecular Biology Letters* **7**, 417-422.
- Jansen, R. C. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**, 205-211.
- Janzen, J. P., Brester, G. W., Smith, V. H., Hall, L. & Box, P. O. (2014). Dry Peas: Trends in Production, Trade, and Price. *Agricultural Marketing Policy Center*.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. (1985). Hypervariable /'minisatellite/' regions in human

- DNA. *Nature* **314**, 67-73.
- Jensen, J. (1989). Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. *Theoretical and Applied Genetics* **78**, 613-618.
- Jing, R., Vershinin, A., Grzebyta, J., Shaw, P., Smykal, P., Marshall, D., Ambrose, M. J., Ellis, T. H. & Flavell, A. J. (2010). The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 44-64.
- Jones, N., Ougham, H. & Thomas, H. (1997). Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytology* **137**, 165-177.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**, 309-334.
- Kearsey, M. J. & Pooni, H. S. (1996). *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. London.
- Khadari, B., El Aabidine, A. Z. & Grout, C. (2010). A Genetic Linkage Map of Olive Based on Amplified Fragment Length Polymorphism, Intersimple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**, 548-555.
- Klein, A., Houtin, H., Rond, C., Marget, P., Jacquin, F., Boucherot, K., Huart, M., Rivière, N., Boutet, G., Lejeune-Hénaut, I. & Burstin, J. (2014). QTL analysis of frost damage in pea suggests different mechanisms involved in frost tolerance. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1319-1330.
- Knight, T. A. (1799). Experiments on the fecundation of vegetables. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **89**, 504-506.
- Knox, M. R. & Ellis, T. H. N. (2002). Excess heterozygosity contributes to genetic map expansion in pea recombinant inbred populations. *Genetics Society of America* **162**, 861-873.
- Kosev, V., Pachev, I., Angelova, S. & Mikic, A. (2012). Inheritance of quantitative traits in crosses between two *Pisum sativum* subspecies with particular reference to their breeding value. *Russian Journal of Genetics* **48**, 50-55.
- Krajewski, P., Bocianowski, J., Gawłowska, M., Kaczmarek, Z., Pniewski, T., Święcicki, W. & Wolko, B. (2012). QTL for yield components and protein content: a multienvironment study

- of two pea (*Pisum sativum* L.) populations. *Euphytica* **183**, 323-336.
- Kumar, C. & Singh, S. P. (2016). Heterosis and inbreeding depression to identify superior F₁ hybrids in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for the yield and its contributing traits. *Journal of Applied and Natural Science* **24**, 290-296.
- Lander, E. S. & Botstein, S. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185-199.
- Langmead B. & Salzberg S. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nature Methods* **9**, 357-359.
- Laucou, V., Haurogné, K., Ellis, N. & Rameau, C. (1998). Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 905-915.
- Lejeune-Hénaut, I., Hanocq, E., Béthencourt, L., Fontaine, V., Delbreil, B., Morin, J., Petit, A., Devaux, R., Boilleau, M., Stempniak, J.J. & Thomas, M. (2008). The flowering locus Hr colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 1105-1116.
- Lekgari, A. & Dweikat, I. (2014). Assessment of Genetic Variability of 142 Sweet Sorghum Germplasm of Diverse Origin with Molecular and Morphological Markers. *Open Journal of Ecology* **4**, 371-393.
- Leon, A. J., Andrade, F. H. & Lee, M. (2003). Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. *Crop Science* **43**, 135-140.
- Leonforte, A., Sudheesh, S., Cogan, N. O. I., Salisbury, P. A., Nicolas, M. E., Materne, M., Forster, J. W. & Kaur, S. (2013). SNP marker discovery, linkage map construction and identification of QTLs for enhanced salinity tolerance in field pea (*Pisum sativum* L.). *BMC Plant Biology* **13**, 161-175.
- Lewis, G. P. (2005). *Legumes of the world*.
- Li, C., Bai, G., Chao, S. & Wang, Z. (2015a). A high-density SNP and SSR consensus map reveals segregation distortion regions in wheat. *BioMed Research International*.
- Li, G. & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 455-461.

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079.
- Li, H., Vikram, P., Singh, R.P., Kilian, A., Carling, J., Song, J., Burgueno-Ferreira, J.A., Bhavani, S., Huerta-Espino, J., Payne, T. & Sehgal, D. (2015b). A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. *BMC Genomics* **16**, 216-231.
- Li, W., Lin, Z. & Zhang, X. (2007). A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboreum* L.) Detected by Molecular Markers. *Journal of Genetics and Genomics* **34**, 634-640.
- Li, W., Zhang, J., Mou, Y., Geng, J., Mc Vetty, P. B. E., Hu, S. & Li, G. (2011). Integration of Solexa sequences on an ultradense genetic map in *Brassica rapa* L. *BMC Genomics* **12**, 249-263.
- Ligarreto, G. & Ospina, A. (2009). Análisis de parámetros heredables asociados al rendimiento y precocidad en arveja voluble (*Pisum sativum* L.) tipo Santa Isabel. *Agronomía Colombiana* **27**, 333-339.
- Lin, Z., Zhang, X., Nie, Y., He, D. & Wu, M. (2003). Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin* **48**, 2063-2067.
- Lin, Z., He, D., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X., Feng, C. & Stewart, J. (2005). Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant Breeding* **124**, 180-187.
- Litt, M. & Luty, J. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**, 397-401.
- Liu, H., Bayer, M., Druka, A., Russell, J. R., Hackett, C. A., Poland, J., Ramsay, L., Hedley, P. E. & Waugh, R. (2014). An evaluation of genotyping by sequencing (GBS) to map the *Breviaristatum-e* (*ari-e*) locus in cultivated barley. *BMC Genomics* **15**, 104-115.
- Loridon, K., McPhee, K., Morin, J., Dubreuil, P., Pilet-Nayel, M.L., Aubert, G., Rameau, C., Baranger, A., Coyne, C., Lejeune-Henaut, I. & Burstin, J. (2005). Microsatellite marker

- polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 1022-1031.
- Lu, F., Lipka, A. E., Glaubitz, J., Elshire, R., Cherney, J. H., Casler, M. D., Buckler, E. S. & Costich, D. E. (2013). Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, and Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. *PLoS Genetics* **9**, e1003215.
- Ma, Y., Holdsworth, W., Mazourek, M., Coyne, C. J. & McGee, R. J. (2015). First Report of the Construction of a Genetic Linkage Map of Pea Using Genotyping By Sequencing. *Plant and Animal Genome Conference*.
- Mahibbur, R. & Govindarajulu, Z. (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilk for normality. *Journal of Applied Statistics* **24**, 219-236.
- Martin, E., Cravero, V., Esposito, A., Lopez Anido, F., Milanesi, L. & Cointy, E. (2008). Identification of markers linked to agronomic traits in globe artichoke. *Australian Journal of Crop Science* **1**, 43-46.
- Martin, E., Cravero, V., Portis, E., Scaglione, D., Acquaviva, E. & Cointy, E. (2013). New genetic maps for globe artichoke and wild cardoon and their alignment with an SSR-based consensus map. *Molecular Breeding* **32**, 177-187.
- Maskus, H. (2010). *Pulse Processing, Functionality and Application*. University of Winnipeg, Manitoba.
- Maxted, N. & Ambrose, M. (2001). Peas (*Pisum* L.). *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*, 181-190. Editorial Springer, Holanda.
- McCallum, J., Timmerman-Vaughan, G., Frew, T. & Russell, A. (1997). Green seed color in pea. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 218-225.
- McPhee, K. E., Inglis, D. A., Gundersen, B. & Coyne, C. J. (2012). Mapping QTL for Fusarium wilt Race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum*). *Plant Breeding* **131**, 300-306.
- Meadley, J. T. & Milbourn, G. M. (1971). The growth of vining peas. III. The effect of shading on abscission of flowers and pods. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **77**, 103-108.
- Mendel, G. (1865). Experiments in Plant Hybridization. *Journal of the Royal Horticultural Society* **4**, 3-47.
- Miles, C. & Wayne, M. (2008). Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Nature Education* **1**, 1-8.

- Mishra, R. K., Chaudhary, S., Kumar, A. & Kumar, S. (2009). Effects of MULTIFOLIATE-PINNA, AFILA, TENDRIL-LESS and UNIFOLIATA genes on leafblade architecture in *Pisum sativum*. *Planta* **230**, 177-190.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, a, Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R. & Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Genome Research*, 87-103.
- Myles, S. (2013). Improving fruit and wine: What does genomics have to offer? *Trends in Genetics* **29**, 190-196.
- Nemecek, T., von Richthofen, J. S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R. & Pahl, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* **28**, 380-393.
- Padmakar, B., Kanupriya, C., Latha, P. M., Prashant, K. S., Dinesh, M. R., Sailaja, D. & Aswath, C. (2015). Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* **192**, 158-165.
- Paterson, A. H., Saranga, Y., Menz, M., Jiang, C. X. & Wright, R. J. (2003). QTL analysis of genotype x environment interactions affecting cotton fiber quality. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 384-396.
- Pilet-Nayel, L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A. & Coyne, C. J. (2002). Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 28-39.
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E. & Jannink, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* **7**, e32253.
- Pootakham, W., Jomchai, N., Ruang-areerate, P., Shearman, J. R., Sonthirod, C., Sangsrakru, D., Tragoonrung, S. & Tangphatsornruang, S. (2015). Genome-wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping-by-sequencing (GBS). *Genomics* **105**, 288-295.
- Prioul, S., Frankewitz, A., Deniot, G., Morin, G. & Baranger, A. (2004). Mapping of quantitative trait loci for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.), at the seedling and adult plant stages. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 1322-1334.

- Rashwan, A. M. A. & El-Shaieny, A. H. (2016). Pedigree selection in pea (*Pisum sativum* L.). *International Journal of Advanced Research* **4**, 1366-1371.
- Rai, R., Singh, A. K., Singh, B. D., Joshi, A. K., Chand, R. & Srivastava, C. P. (2011). Molecular mapping for resistance to pea rust caused by *Uromyces fabae* (Pers.) de-Bary. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 803-813.
- Romay, M.C., Millard, M.J., Glaubitz, J.C., Peiffer, J.A., Swarts, K.L., Casstevens, T.M., Elshire, R.J., Acharya, C.B., Mitchell, S.E., Flint-Garcia, S.A. & McMullen, M.D. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. *Genome Biology* **14**, R55-R73.
- Rowan, B. A., Patel, V., Weigel, D. & Schneeberger, K. (2015). Rapid and Inexpensive Whole-Genome Genotyping-by-Sequencing for Crossover Localization and Fine-Scale Genetic Mapping. *Genes, Genomes, Genetics* **5**, 385-398.
- Ruiz Corral, J. A., Medina Garcia, G., González Acuña, I. J., Flores Lopez, H. E., Ramírez Ojeda, G., Ortíz Trejo, C., Byerly Murphy, K. F. & Martínez Parra, R. A. (2013). *Requerimientos agroecológicos de cultivos*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sarawat, P., Stoddard, F. L., Marshall, D. R. & Ali, S. M. (1994). Heterosis for yield and related characters in pea. *Euphytica* **80**, 39-48.
- Sarikamiş, G., Yanmaz, R., Ermiş, S., Bakir, M. & Yüksel, C. (2010). Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genetics and Molecular Research* **9**, 591-600.
- Schaefer, H., Hechenleitner, P., Santos-Guerra, A., Menezes de Sequeira, M., Pennington, R. T., Kenicer, G. & Carine, M. A. (2012). Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 250-269.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. & Ndjiondjop, M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* **5**, 2569-2587.

- Shunmugam, A. S., Liu, X., Stonehouse, R., Tar'an, B., Bett, K. E., Sharpe, A. G. & Warkentin, T. D. (2015). Mapping seed phytic acid concentration and iron bioavailability in a pea recombinant inbred line population. *Crop Science* **55**, 828-836.
- Sindhu, A. *et al.* (2014). Gene-based SNP discovery and genetic mapping in pea. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 2225-2241.
- Singh, B. D. (2005). *Plant Breeding: Principles and Methods*. Kalyani. New Dehli.
- Smith, R., Sheppard, K., DiPetrillo, K. & Churchill, G. (2009). Quantitative trait locus analysis using J/ql. *Cardiovascular genomics: Methods and protocols*, 175-188.
- Smýkal, P. & Konečná, E. (2014). Advances in Pea Genomics. *Legumes in the Omic Era*, 301-337.
- Smýkal, P., Horacek, J., Dostalova, R. & Hybl, M. (2008). Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of Applied Genetics* **49**, 155-66.
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J. & Ellis, N.T. (2011). Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* **9**, 4-18.
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C.J., Ellis, N.T., Flavell, A.J., Ford, R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P. & McPhee, K.E. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* **2**, 74-115.
- Smýkal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M.J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Greene, S.L., Nelson, M.N., Besharat, N. & Vymyslický, T. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 43-104.
- Stam, P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *The Plant Journal* **3**, 739-744.
- Sudheesh, S., Lombardi, M., Leonforte, A., Cogan, N. O. I., Materne, M., Forster, J. W. & Kaur, S. (2014). Consensus Genetic Map Construction for Field Pea (*Pisum sativum* L.), Trait Dissection of Biotic and Abiotic Stress Tolerance and Development of a Diagnostic Marker for the *er1* Powdery Mildew Resistance Gene. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**, 1391-1403.

- Sun, X., Yang, T., Hao, J., Zhang, X., Ford, R., Jiang, J., Wang, F., Guan, J. & Zong, X. (2014). SSR genetic linkage map construction of pea (*Pisum sativum* L.) based on Chinese native varieties. *The Crop Journal* **2**, 170-174.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P. B. E. & Li, G. (2007). An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1305-1317.
- Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* **27**, 205-233.
- Tar'an, B., Warkentin, T., Somers, D.J., Miranda, D., Vandenberg, A., Blade, S., Woods, S., Bing, D., Xue, A., DeKoeyer, D. & Penner, G. (2003). Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1482-1491.
- Tar'an, B., Warkentin, T., Somers, D. J., Miranda, D., Vandenberg, A., Blade, S. & Bing, D. (2004). Identification of quantitative trait loci for grain yield , seed protein concentration and maturity in field pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* **136**, 297-306.
- Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. & Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* **48**, 257-272.
- Taranto, F., D'Agostino, N., Greco, B., Cardi, T. & Tripodi, P. (2016). Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing. *BMC Genomics* **17**, 943.
- Tayeh, N., Aluome, C., Falque, M., Jacquin, F., Klein, A., Chauveau, A., Bérard, A., Houtin, H., Rond, C., Kreplak, J. & Boucherot, K. (2015a). Development of two major resources for pea genomics: The GenoPea 13.2K SNP Array and a high-density, high-resolution consensus genetic map. *Plant Journal* **84**, 1257-1273.
- Tayeh, N., Aubert, G., Pilet-Nayel, M.-L., Lejeune-Hénaut, I., Warkentin, T. D. & Burstin, J. (2015b). Genomic Tools in Pea Breeding Programs: Status and Perspectives. *Frontiers in Plant Science* **6**, Article 1037.
- Tester, M. & Langridge, P. (2010). Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science* **327**, 818-822.
- Timmerman-Vaughan, G. M., McCallum, J. A., Frew, T. J., Weeden, N. F. & Russell, A. C.

- (1996). Linkage mapping of quantitative trait loci controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 431-439.
- Timmerman-Vaughan, G. M., Frew, T. J., Russell, A. C., Khan, T., Butler, R., Gilpin, M., Murray, S. & Falloon, K. (2002). QTL mapping of partial resistance to field epidemics of *Ascochyta* blight of pea. *Crop Science* **42**, 2100-2111.
- Timmerman-Vaughan, G. M., Frew, T. J., Butler, R., Murray, S., Gilpin, M., Falloon, K., Johnston, P., Lakeman, M. B., Russell, A. & Khan, T. (2004). Validation of quantitative trait loci for *Ascochyta* blight resistance in pea (*Pisum sativum* L.), using populations from two crosses. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1620-31.
- Timmerman-Vaughan, G. M., Mills, A., Whitfield, C., Frew, T., Butler, R., Murray, S., Lakeman, M., McCallum, J., Russell, A. & Wilson, D. (2005). Linkage mapping of QTL for seed yield, yield components, and developmental traits in pea. *Crop Science* **45**, 1336-1344.
- Tiwari, G. & Lavanya, G. (2012). Genetic variability, character association and component analysis in F₄ generation of fieldpea (*Pisum sativum* var. *arvense* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* **25**, 173-175.
- Togay, N., Togay, Y., Yildirim, B. & Dogan, Y. (2008). Relationships between yield and some yield components in Pea (*Pisum sativum* ssp *arvense* L.) genotypes by using correlation and path analysis. *African Journal of Biotechnology* **7**, 4285-4287.
- Touré, A., Haussmann, B. I. G., Jones, N., Thomas, H. & Ougham, H. (1999). Construction of a genetic map, mapping of major genes, and QTL analysis. *Application of Molecular Markers in Plant Breeding*, 17-34.
- Treangen, T. J. & Salzberg, S. L. (2013). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Natural Review of Genetics* **13**, 36-46.
- Ubayasena, L., Bett, K., Tar'an, B., Vijayan, P. & Warkentin, T. (2010). Genetic control and QTL analysis of cotyledon bleaching resistance in green field pea (*Pisum sativum* L.). *Genome* **53**, 346-359.
- Ubayasena, L., Bett, K., Tar'an, B. & Warkentin, T. (2011). Genetic control and identification of QTLs associated with visual quality traits of field pea (*Pisum sativum* L.). *Genome* **54**, 261-272.
- Upadhyaya, H.D., Dwivedi, S.L., Ambrose, M., Ellis, N., Berger, J., Smýkal, P., Debouck, D.,

- Duc, G., Dumet, D., Flavell, A. & Sharma, S.K (2011). Legume genetic resources: Management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. *Euphytica* **180**, 27-47.
- UPOV (2009). Directrices para la ejecución del examen de distinción, la homogeneidad y la estabilidad.
- Utz, H. F., Melchinger, A. E. & Schön, C. C. (2000). Bias and sampling error of the estimated proportion of genotypic variance explained by quantitative trait loci determined from experimental data in maize using cross validation and validation with independent samples. *Genetics* **154**, 1839-1849.
- Van Ooijen, J. W. (2006). *Joinmap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*.
- Verma, P., Goyal, R., Chahota, R. K., Sharma, T. R., Abdin, M. Z. & Bhatia, S. (2015). Construction of a genetic linkage map and identification of QTLs for seed weight and seed size traits in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *PLoS ONE* **10**, 1-17.
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* **93**, 77-78.
- Vos, P., Hogers, R., M. B., Reijans, M. & T. L. (1995). A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **44**, 388-396.
- Wang, D. G. (1998). Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* **280**, 1077-1082.
- Wang, J., Yao, J. & Li, W. (2008). Construction of a molecular map for melon (*Cucumis melo* L.) based on SRAP. *Frontiers of Agriculture in China* **2**, 451-455.
- Wang, S., Basten, C. J. & Zeng, Z. B. (2012). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, Z. & Xiang, C. (2013). Genetic mapping of QTLs for horticulture traits in a F₂₋₃ population of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Euphytica* **193**, 235-250.
- Warkentin, T.D., Smýkal, A.P.P., Coyne, C.J., Weeden, N., Domoney, C., Bing, D.J., Leonforte, A., Xuxiao, Z., Dixit, G.P., Boros, L. & McPhee, K.E. (2015). Pea. *Grain Legumes*, 37-46. Editorial Springer, Nueva York.
- Weeden, N. F. & Porter, L. (2007). The genetic basis of *Fusarium* root rot tolerance in the

- Afghanistan pea. *Pisum Genetics* **39**, 2-3.
- Weeden, N. F., Ellis, T. H. N., Timmerman-Vaughan, G. M., Swiecicki, W. K., Rozov, S. M., & Berdnikov, V. A. (1998). A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* **30**, 1-4.
- Weeden, N., McGee, R., Grau, C. & Muehlbauer, F. (2000). A gene influencing tolerance to common root rot is located on linkage group IV. *Pisum Genetics* **32**, 53-55.
- Weeden, N. F., Brauner, S. & Przyborowski, J. (2002). Genetic Analysis of Pod Dehiscence in Pea (*Pisum Sativum* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters* **7**, 657-663.
- Weller, J. L., Hecht, V., Liew, L. C., Sussmilch, F. C., Wenden, B., Knowles, C. L. & Vander Schoor, J. K. (2009). Update on the genetic control of flowering in garden pea. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2493-2499.
- Weller, J.L., Liew, L.C., Hecht, V.F., Rajandran, V., Laurie, R.E., Ridge, S., Wenden, B., Vander Schoor, J.K., Jaminon, O., Blassiau, C. & Dalmais, M. (2012). A conserved molecular basis for photoperiod adaptation in two temperate legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 21158-63.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Winter, P. & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **11**, 438-448.
- Yang, T., Fang, L., Zhang, X., Hu, J., Bao, S., Hao, J., Li, L., He, Y., Jiang, J., Wang, F. & Tian, S. (2015). High-throughput development of SSR markers from pea (*Pisum sativum* L.) based on next generation sequencing of a Purified Chinese commercial variety. *PLoS ONE* **10**, 1-14.
- Yu, J., Yu, S., Lu, C., Wang, W., Fan, S., Song, M., Lin, Z., Zhang, X. & Zhang, J. (2007). High-density linkage map of cultivated allotetraploid cotton based on SSR, TRAP, SRAP and AFLP markers. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 716-724.
- Zeng, Z. (1994). Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *The Genetics Society of America* **136**, 1457-1468.
- Zhang, C., Tar'an, B., Warkentin, T., Tullu, A., Bett, K. E., Vandenberg, B. & Somers, D. J. (2006). Selection for lodging resistance in early generations of field pea by molecular

- markers. *Crop science* **46**, 321-329.
- Zhang, F., Chen, S., Chen, F., Fang, W., Deng, Y., Chang, Q. & Liu, P. (2011). Genetic analysis and associated SRAP markers for flowering traits of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Euphytica* **177**, 15-24.
- Zhang, R. ping, Wu, J., Li, X. gen, Khan, M. A., Chen, H., Korban, S. S. & Zhang, S. ling (2013). An AFLP, SRAP, and SSR Genetic Linkage Map and Identification of QTLs for Fruit Traits in Pear (*Pyrus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* **31**, 678-687.
- Zhang, W., He, H., Guan, Y., Du, H., Yuan, L., Li, Z., Yao, D., Pan, J. & Cai, R. (2010). Identification and mapping of molecular markers linked to the tuberculate fruit gene in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 645-54.
- Zhang, Y. M. & Xu, S. (2004). Mapping Quantitative Trait Loci in F₂ Incorporating Phenotypes of F₃ Progeny. *Genetics* **166**, 1981-1993.
- Zhao, B., Deng, Q., Zhang, Q., Li, J. & Ye, S. (2006). Analysis of Segregation Distortion of Molecular Markers in F₂ Population of Rice. *Acta Genética Sinica* **33**, 449-457.
- Zhou, W., Tang, Z., Hou, J., Hu, N. & Yin, T. (2015). Genetic map construction and detection of genetic loci underlying segregation distortion in an intraspecific cross of *Populus deltoides*. *PLoS ONE* **10**, 1-13.

12. ANEXOS

Tabla 29. Medias para cada una de las familias en los años evaluados y valor *p* asociado a la prueba *T* de Student ($p < 0,05$) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los mismos. NS: número de semillas por planta, NV: número de vainas por planta, DS: diámetro de semilla (cm), AP: altura de planta (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela, SV: número de semillas por vaina, AV: ancho de la vaina (cm), LV: longitud de la vaina (cm), PS: peso de semilla (g).

Familia	2014	2015	Valor <i>p</i>	2014	2015	Valor <i>p</i>	2014	2015	Valor <i>p</i>
	NS			NV			DS		
1	85,900	184,830	0,000	35,100	51,830	0,007	0,500	0,470	0,543
2	143,800	177,940	0,193	50,500	47,990	0,125	0,440	0,510	0,053
3	74,500	121,570	0,009	27,100	37,720	0,138	0,480	0,460	0,300
4	117,200	151,360	0,116	44,500	45,910	0,488	0,480	0,460	0,676
5	251,333	350,960	0,017	109,667	109,380	0,990	0,540	0,570	0,513
6	103,000	135,710	0,149	43,200	44,410	0,717	0,510	0,570	0,248
7	127,700	114,660	0,953	43,300	31,870	0,331	0,510	0,550	0,277
8	153,400	231,000	0,605	51,600	72,420	0,025	0,570	0,630	0,243
11	75,400	193,590	0,156	25,000	67,570	0,079	0,490	0,560	0,089
12	166,225	227,220	0,066	55,150	67,840	0,009	0,520	0,630	0,090
13	101,300	215,040	0,065	46,300	62,750	0,681	0,550	0,610	0,355
14	157,300	177,140	0,537	48,400	49,470	0,264	0,460	0,560	0,242
15	121,500	105,590	0,109	46,625	36,840	0,204	0,510	0,520	0,794
16	121,100	202,500	0,041	40,500	55,500	0,350	0,540	0,590	0,019
17	133,667	294,250	0,436	43,000	84,250	0,080	0,490	0,570	0,007
18	103,000	182,630	0,385	33,200	44,650	0,240	0,480	0,650	0,064
19	235,600	236,590	0,477	77,200	70,000	0,570	0,520	0,580	0,361
20	108,500	174,140	0,121	46,800	58,300	0,027	0,470	0,560	0,145
22	110,000	235,250	0,019	34,200	58,080	0,059	0,510	0,640	0,079
23	100,200	167,630	0,132	31,600	48,380	0,058	0,510	0,500	0,699
24	147,200	139,630	0,518	44,600	44,360	0,875	0,510	0,630	0,054
25	132,750	312,270	0,134	37,542	80,350	0,125	0,520	0,550	0,677
26	119,600	191,140	0,002	34,300	50,180	0,014	0,480	0,510	0,682
29	133,500	182,970	0,066	46,100	54,600	0,406	0,500	0,630	0,191
30	98,900	163,780	0,002	38,625	56,500	0,014	0,520	0,560	0,380
31	77,100	179,300	0,064	32,000	55,950	0,098	0,530	0,630	0,106
32	138,200	150,750	0,380	47,975	53,400	0,145	0,510	0,540	0,198
33	104,425	182,800	0,055	43,500	63,420	0,106	0,490	0,560	0,144
34	117,000	130,340	0,190	41,400	44,280	0,754	0,530	0,620	0,183
36	152,900	163,000	0,558	55,175	51,320	0,856	0,520	0,540	0,785
37	159,200	126,710	0,683	53,600	32,250	0,363	0,520	0,620	0,072
38	122,300	148,400	0,097	51,600	47,500	0,663	0,520	0,610	0,072
39	150,700	156,480	0,921	54,800	49,110	0,705	0,500	0,580	0,285
40	105,800	201,870	0,058	37,900	61,280	0,030	0,490	0,650	0,019
41	114,100	149,930	0,191	41,000	48,460	0,736	0,540	0,640	0,121
42	122,500	141,190	0,569	39,200	41,130	0,697	0,520	0,590	0,039
43	138,000	371,030	0,015	60,000	137,500	0,012	0,540	0,650	0,058
45	97,000	146,440	0,504	39,800	47,270	0,715	0,470	0,630	0,019
46	128,250	150,480	0,291	47,200	48,390	0,444	0,480	0,620	0,117
47	80,500	178,350	0,007	31,500	48,400	0,771	0,500	0,600	0,383
48	216,000	322,170	0,275	77,333	102,340	0,276	0,460	0,610	0,006

49	129,800	151,670	0,175	43,300	44,750	0,589	0,530	0,610	0,042
50	145,083	228,960	0,181	64,417	75,420	0,279	0,570	0,670	0,063
51	98,300	124,240	0,575	33,800	40,610	0,642	0,480	0,670	0,097
52	88,750	319,250	0,033	40,500	83,500	0,132	0,500	0,640	0,022
54	127,500	139,290	0,842	43,800	39,340	0,195	0,520	0,570	0,895
55	122,500	133,800	0,279	39,900	40,290	0,537	0,490	0,490	>0,9999
56	156,800	126,450	0,816	52,125	35,600	0,856	0,510	0,530	0,626
57	80,000	482,670	0,031	35,500	146,670	0,006	0,510	0,730	0,058
58	79,600	209,190	0,117	30,200	66,480	0,116	0,490	0,600	0,222
59	251,167	240,830	0,742	87,167	92,570	0,583	0,510	0,640	0,264
60	136,800	139,970	0,168	47,200	35,070	0,790	0,520	0,510	0,831
61	63,500	93,120	0,601	25,600	28,000	0,458	0,490	0,540	0,228
62	216,800	352,090	0,426	71,800	116,420	0,244	0,510	0,610	0,034
63	116,300	165,650	0,517	43,500	52,390	0,421	0,470	0,600	0,075
64	125,400	149,600	0,851	41,500	41,600	0,990	0,520	0,570	0,170
65	114,600	160,400	0,113	38,700	47,650	0,919	0,530	0,620	0,057
66	86,200	151,450	0,101	34,000	46,200	0,554	0,540	0,560	0,652
67	136,875	466,250	0,027	51,000	116,250	0,062	0,530	0,510	0,155
68	91,200	190,360	0,038	35,800	59,950	0,063	0,530	0,540	0,746
72	145,067	165,550	0,287	49,300	45,950	0,559	0,510	0,600	0,255
73	123,600	155,200	0,730	43,000	52,390	0,948	0,480	0,600	0,004
75	186,000	184,390	0,811	57,500	48,180	0,282	0,480	0,500	0,676
76	132,500	215,950	0,495	49,500	61,640	0,641	0,520	0,580	0,198
77	138,000	184,370	0,221	49,900	53,280	0,280	0,510	0,590	0,219
78	139,100	194,590	0,778	36,100	53,700	0,738	0,490	0,540	0,237
79	123,200	138,390	0,720	48,000	52,440	0,771	0,510	0,550	0,057
80	126,500	300,960	0,227	49,500	90,630	0,151	0,510	0,580	0,053
81	85,100	142,050	0,544	28,200	41,200	0,617	0,520	0,490	0,500
82	81,200	144,500	0,249	30,800	40,890	0,101	0,510	0,560	0,237
84	187,000	266,670	0,301	64,667	86,170	0,274	0,460	0,680	0,004
86	77,300	167,170	0,286	28,000	46,940	0,488	0,470	0,530	0,312
87	106,600	147,760	0,377	39,200	46,370	0,227	0,490	0,450	0,451
88	93,700	177,160	0,337	33,225	45,630	0,605	0,510	0,610	0,192
89	50,700	115,360	0,234	22,700	38,290	0,324	0,500	0,480	0,794
90	106,600	115,670	0,833	39,800	39,520	0,985	0,470	0,520	0,087
91	219,250	385,710	0,171	67,000	92,790	0,193	0,510	0,510	>0,9999
92	111,800	180,290	0,044	37,200	43,670	0,099	0,520	0,530	0,312
93	134,200	165,010	0,349	50,800	48,210	0,575	0,550	0,530	0,106
95	105,900	156,700	0,077	37,700	43,100	0,123	0,510	0,610	0,285
96	86,667	144,500	0,462	27,633	41,120	0,718	0,510	0,520	0,205
98	91,900	205,150	0,110	30,550	50,150	0,018	0,510	0,630	0,087
99	144,700	219,910	0,078	55,500	65,590	0,718	0,480	0,610	0,028
102	207,458	223,750	0,184	75,583	67,380	0,525	0,510	0,530	0,699
105	81,725	119,190	0,444	24,625	31,080	0,939	0,490	0,560	0,207
111	47,500	159,170	0,026	29,000	63,000	0,014	0,570	0,510	0,268
113	97,270	108,780	0,029	29,590	28,790	0,802	0,510	0,540	0,198
114	162,867	248,090	0,047	52,833	54,650	0,573	0,480	0,520	0,602
115	114,900	183,290	0,249	46,200	54,720	0,355	0,490	0,560	0,022
118	213,500	264,330	0,082	75,500	87,840	0,106	0,510	0,520	0,808
119	115,250	114,000	0,632	38,500	35,170	0,955	0,500	0,550	0,323
120	150,450	214,810	0,504	52,700	53,500	0,385	0,510	0,490	0,155
121	136,250	204,420	0,110	44,000	57,500	0,137	0,520	0,560	0,636
122	192,667	278,000	0,185	55,042	82,590	0,339	0,520	0,510	0,831

123	84,500	316,340	0,003	26,000	90,340	0,001	0,560	0,590	0,772
124	188,400	201,150	0,219	56,600	63,380	0,742	0,480	0,510	0,312
125	169,300	155,490	0,864	67,200	48,210	0,045	0,520	0,570	0,030
126	128,900	129,000	0,960	36,700	32,370	0,773	0,550	0,530	0,801
127	101,000	119,790	0,549	39,400	43,380	0,354	0,490	0,470	0,155
128	146,333	313,670	0,119	70,000	105,500	0,165	0,520	0,640	0,028
130	81,333	231,250	0,000	25,167	56,600	0,574	0,510	0,510	>0,9999
131	115,833	303,630	0,000	40,167	98,500	0,007	0,500	0,560	0,238
132	116,300	191,610	0,095	39,700	47,580	0,472	0,530	0,600	0,126
133	54,700	201,170	0,035	17,600	52,170	0,064	0,480	0,540	0,366
134	79,700	170,020	0,064	30,400	55,600	0,124	0,520	0,540	0,500
135	88,400	160,820	0,066	31,000	47,870	0,543	0,480	0,510	0,677
136	111,000	205,620	0,021	37,550	63,740	0,045	0,510	0,510	0,930
137	131,700	167,170	0,359	45,300	44,550	0,446	0,510	0,520	0,553
138	128,000	166,310	0,384	53,400	49,000	0,453	0,420	0,600	0,044
140	59,100	147,200	0,077	18,100	40,250	0,848	0,480	0,550	0,089
AP				DF			SV		
1	77,900	105,530	0,026	96,000	87,000	0,161	2,447	3,570	0,021
2	80,700	97,720	0,053	84,000	82,000	0,592	2,853	3,710	0,194
3	77,000	85,210	0,395	89,000	83,000	0,105	2,749	3,250	0,372
4	79,200	100,500	0,121	85,500	83,000	0,155	2,634	3,300	0,145
5	82,200	99,130	0,141	77,500	79,000	0,814	2,292	3,210	0,016
6	90,100	89,770	0,953	84,500	82,000	0,300	2,384	3,070	0,033
7	95,570	77,110	0,149	86,000	88,000	0,295	2,949	3,520	0,149
8	84,000	115,800	0,009	81,500	82,500	0,592	2,973	3,220	0,133
11	74,700	92,940	0,342	87,000	85,500	0,312	3,016	2,840	0,373
12	74,300	95,660	0,140	88,000	84,500	0,090	3,014	3,340	0,445
13	85,700	102,700	0,296	82,500	86,500	0,127	2,188	3,420	0,038
14	58,400	84,890	0,000	81,500	81,000	0,958	3,250	3,600	0,279
15	75,400	96,630	0,185	92,500	85,000	0,042	2,606	2,910	0,644
16	82,200	95,460	0,380	94,000	86,500	0,339	2,990	3,670	0,016
17	81,600	74,000	0,083	92,000	90,000	0,705	3,109	3,410	0,413
18	76,400	75,410	0,906	81,000	80,000	0,500	3,102	4,090	0,062
19	79,500	90,170	0,603	87,000	87,500	0,500	3,052	3,430	0,128
20	72,600	128,780	0,040	83,500	85,000	0,493	2,318	2,990	0,956
22	70,270	79,920	0,508	90,500	87,500	0,486	3,216	4,050	0,048
23	77,100	80,750	0,661	87,000	90,000	0,312	3,171	3,460	0,284
24	98,700	107,520	0,425	84,000	85,500	0,543	3,300	3,140	0,881
25	70,600	89,500	0,053	87,500	89,000	0,543	3,536	3,850	0,146
26	80,100	76,990	0,808	84,500	83,000	0,312	3,487	3,810	0,036
29	76,100	105,630	0,065	90,000	83,500	0,234	2,896	3,400	0,016
30	61,250	102,610	0,014	86,000	85,000	0,758	2,561	2,900	0,518
31	56,100	99,780	0,011	87,000	85,000	0,733	2,409	3,210	0,054
32	79,100	95,300	0,300	86,000	87,000	0,293	2,881	2,820	0,755
33	74,500	108,500	0,023	85,500	80,000	0,437	2,401	2,910	0,341
34	67,800	88,110	0,112	87,000	86,500	0,699	2,826	2,940	0,257
36	81,600	99,400	0,110	88,000	85,500	0,349	2,771	3,170	0,025
37	73,100	86,040	0,412	85,000	85,500	0,885	2,970	3,950	0,017
38	81,800	103,970	0,096	85,000	85,000	>0,9999	2,370	3,170	0,090
39	86,800	101,980	0,178	88,000	85,000	0,616	2,750	3,270	0,312
40	76,300	99,840	0,079	85,000	80,500	0,465	2,792	3,310	0,424
41	83,600	96,830	0,218	87,000	85,000	0,293	2,783	3,110	0,076
42	76,200	97,920	0,106	87,000	82,500	0,057	3,125	3,510	0,246

43	76,000	91,250	0,134	84,000	82,000	0,295	2,300	2,700	0,126
45	83,900	111,230	0,091	81,500	80,000	0,205	2,437	3,100	0,048
46	89,300	99,440	0,437	86,000	87,000	0,500	2,717	3,110	0,737
47	77,150	104,950	0,009	82,500	83,500	0,764	2,556	3,690	0,023
48	83,750	80,250	0,901	83,250	90,000	0,310	2,793	3,110	0,240
49	92,800	93,800	0,918	87,500	87,000	0,699	2,998	3,390	0,343
50	77,800	90,090	0,261	81,000	81,500	0,699	2,252	3,060	0,013
51	79,640	102,390	0,190	93,500	86,000	0,278	2,908	3,060	0,653
52	82,700	94,750	0,247	89,000	82,000	0,384	2,191	3,860	0,030
54	85,590	91,170	0,752	82,000	87,000	0,255	2,911	3,530	0,144
55	75,200	87,710	0,160	88,500	86,500	0,106	3,070	3,370	0,223
56	76,750	101,750	0,115	87,500	82,500	0,087	3,008	3,530	0,239
57	76,900	90,250	0,361	87,000	84,000	0,205	2,254	3,310	0,020
58	76,100	95,590	0,048	87,500	88,500	0,592	2,636	3,140	0,345
59	76,300	89,840	0,397	92,000	85,000	0,089	2,881	2,650	0,232
60	67,250	89,170	0,000	91,000	88,500	0,349	2,898	4,260	0,063
61	74,100	92,350	0,208	85,500	84,000	0,312	2,480	3,320	0,245
62	79,340	98,500	0,001	69,000	79,000	0,030	3,019	3,020	0,926
63	85,970	100,550	0,199	86,500	82,500	0,030	2,674	3,160	0,1656
64	71,200	108,390	0,028	84,500	81,500	0,412	3,022	3,600	0,202
65	79,900	93,000	0,138	84,000	88,000	0,106	2,961	3,380	0,178
66	78,000	105,460	0,017	90,000	85,000	0,344	2,535	3,280	0,014
67	92,300	88,500	0,587	84,000	83,500	0,500	2,684	4,000	0,031
68	66,000	85,930	0,002	88,000	86,500	0,205	2,547	3,180	0,055
72	92,600	106,050	0,148	86,500	82,500	0,030	2,943	3,610	0,355
73	88,340	102,310	0,255	83,500	84,500	0,764	2,874	3,130	0,575
75	71,900	103,460	0,054	82,000	82,500	0,500	3,235	3,880	0,065
76	84,800	88,980	0,285	83,500	82,500	0,733	2,677	3,430	0,309
77	84,600	94,250	0,460	91,500	83,000	0,017	2,766	3,440	0,159
78	81,600	86,820	0,529	85,000	84,500	0,808	3,853	3,640	0,136
79	80,600	98,630	0,047	86,000	83,500	0,126	2,567	2,680	0,723
80	80,900	82,170	0,940	92,500	89,500	0,198	2,556	3,270	0,738
81	88,200	97,550	0,385	92,500	84,500	0,219	3,018	3,470	0,420
82	93,950	95,180	0,862	88,000	84,500	0,667	2,636	3,530	0,023
84	73,250	93,920	0,354	71,500	84,000	0,026	2,892	3,060	0,313
86	81,630	94,530	0,257	83,000	72,000	0,366	2,761	3,580	0,002
87	78,100	90,950	0,216	91,500	86,500	0,019	2,719	3,190	0,742
88	86,740	82,230	0,715	88,000	83,500	0,533	2,820	3,890	0,156
89	79,500	97,110	0,003	89,000	82,000	0,090	2,233	3,000	0,128
90	71,500	94,340	0,148	86,000	84,000	0,553	2,668	2,990	0,314
91	70,500	97,590	0,073	72,000	83,500	0,188	3,272	4,110	0,035
92	92,200	91,550	0,948	86,500	86,500	>0,9999	3,005	4,130	0,040
93	70,500	97,630	0,054	90,000	85,500	0,057	2,642	3,440	0,256
95	76,790	103,020	0,129	92,000	86,000	0,205	2,809	3,620	0,603
96	73,000	76,840	0,973	80,500	86,000	0,058	3,136	3,550	0,318
98	90,100	98,700	0,361	89,500	84,500	0,019	3,008	4,100	0,024
99	83,800	93,450	0,045	78,500	82,000	0,192	2,607	3,340	0,252
102	69,140	80,100	0,250	81,500	86,000	0,057	2,745	3,300	0,762
105	79,800	81,100	0,615	91,000	86,000	0,242	3,319	3,800	0,210
111	90,300	106,340	0,480	88,500	86,500	0,652	1,638	2,530	0,457
113	75,000	90,800	0,423	87,000	87,500	0,808	3,292	3,770	0,069
114	65,780	100,630	0,120	84,000	82,000	0,466	3,083	4,540	0,061
115	86,500	101,210	0,011	76,500	82,000	0,355	2,487	3,350	0,016

118	74,130	85,000	0,225	89,750	84,000	0,104	2,828	3,040	0,141
119	73,200	68,170	0,381	93,000	90,500	0,344	2,994	3,520	0,710
120	98,700	86,290	0,050	85,500	85,500	>0,9999	2,855	4,050	0,001
121	89,200	86,500	0,216	81,500	85,500	0,030	3,097	3,550	0,153
122	61,250	91,790	0,004	90,500	85,000	0,178	3,500	3,370	0,758
123	70,000	99,670	0,022	79,000	85,000	0,033	3,250	3,500	0,567
124	84,780	82,800	0,852	87,500	86,000	0,205	3,329	4,170	0,007
125	84,250	91,200	0,691	74,000	81,000	0,177	2,519	2,720	0,847
126	66,090	75,070	0,280	93,000	87,000	0,205	3,512	3,990	0,561
127	79,200	89,410	0,570	84,000	89,000	0,242	2,563	2,790	0,645
128	97,200	93,750	0,656	80,500	81,250	0,590	2,090	2,980	0,045
130	88,600	77,750	0,510	88,000	86,500	0,205	3,232	3,620	0,393
131	85,200	96,000	0,188	80,000	80,500	0,869	2,884	3,090	0,487
132	83,840	88,610	0,548	90,500	88,000	0,662	2,929	4,030	0,037
133	71,420	97,390	0,159	79,000	81,500	0,871	3,108	3,860	0,045
134	61,830	100,260	0,082	87,000	83,500	0,143	2,622	3,070	0,143
135	70,100	76,500	0,529	93,000	89,000	0,333	2,852	3,360	0,065
136	70,130	103,040	0,172	93,000	88,000	0,255	2,956	3,210	0,182
137	80,500	75,000	0,616	87,000	84,500	0,155	2,907	3,760	0,026
138	58,000	94,110	0,020	76,500	83,000	0,294	2,397	3,420	0,218
140	79,800	91,900	0,258	84,000	86,500	0,500	3,265	3,660	0,743
	AV			LV			PS		
1	0,920	1,080	0,045	5,840	6,210	0,298	0,160	0,190	0,168
2	1,010	1,010	>0,9999	6,280	6,480	0,699	0,120	0,200	0,037
3	0,960	1,050	0,170	6,030	6,320	0,493	0,160	0,210	0,126
4	0,940	1,010	0,512	6,380	6,440	0,802	0,140	0,180	0,232
5	1,020	1,010	0,953	6,380	6,230	0,818	0,200	0,180	0,300
6	1,100	1,060	0,642	6,030	6,120	0,697	0,210	0,200	0,913
7	0,980	1,030	0,684	6,250	6,670	0,577	0,160	0,220	0,019
8	1,090	1,060	0,870	6,370	6,160	0,748	0,170	0,210	0,090
11	0,980	1,010	0,668	6,460	5,900	0,162	0,190	0,210	0,571
12	0,950	1,010	0,117	6,140	6,210	0,801	0,180	0,180	>0,9999
13	1,110	1,040	0,088	6,100	6,550	0,004	0,200	0,200	0,699
14	1,060	0,940	0,294	6,230	6,300	0,880	0,150	0,200	0,058
15	0,930	1,070	0,111	6,050	6,390	0,534	0,160	0,190	0,106
16	0,910	1,010	0,383	5,740	5,910	0,667	0,170	0,190	0,543
17	0,810	0,960	0,166	5,600	5,520	0,746	0,150	0,170	0,910
18	1,060	1,050	0,746	6,370	6,700	0,042	0,150	0,200	0,070
19	1,090	1,160	0,542	6,420	6,690	0,624	0,170	0,180	0,705
20	0,930	1,000	0,526	5,620	6,240	0,144	0,150	0,200	0,072
22	0,930	1,010	0,030	5,540	6,120	0,010	0,170	0,190	0,295
23	1,010	0,990	0,652	6,170	6,030	0,389	0,160	0,150	0,699
24	1,000	1,030	0,486	5,600	6,150	0,009	0,180	0,180	>0,9999
25	0,940	1,080	0,038	5,430	6,030	0,115	0,160	0,180	0,500
26	1,030	1,040	0,863	5,950	6,390	0,266	0,160	0,190	0,126
29	0,960	1,040	0,204	6,520	6,330	0,719	0,180	0,190	0,515
30	0,990	0,930	0,144	6,090	5,960	0,764	0,180	0,180	>0,9999
31	1,030	1,020	0,880	5,640	6,030	0,380	0,180	0,200	0,295
32	1,010	0,980	0,648	6,140	6,410	0,413	0,170	0,190	0,293
33	1,070	1,030	0,156	6,070	6,070	>0,9999	0,190	0,210	0,295
34	0,900	1,020	0,143	6,170	6,590	0,433	0,180	0,210	0,198
36	0,920	1,020	0,350	6,050	6,040	0,981	0,160	0,180	0,466
37	0,910	1,020	0,352	6,040	6,290	0,113	0,190	0,180	0,860

38	0,930	0,960	0,836	6,080	6,120	0,934	0,190	0,180	0,808
39	1,060	1,120	0,629	5,960	6,080	0,779	0,180	0,170	0,500
40	1,000	1,020	0,836	6,030	6,470	0,239	0,170	0,210	0,127
41	1,160	1,110	0,380	6,310	6,470	0,019	0,180	0,180	0,500
42	1,050	1,070	0,642	6,550	6,670	0,798	0,180	0,210	0,051
43	1,010	1,030	0,795	6,350	6,210	0,231	0,210	0,200	0,795
45	1,030	1,100	0,503	5,590	5,900	0,511	0,150	0,210	0,117
46	0,990	0,990	>0,9999	6,670	6,780	0,625	0,150	0,190	0,295
47	1,010	1,010	0,808	6,300	6,500	0,605	0,180	0,180	>0,9999
48	0,760	0,970	0,015	5,310	5,680	0,074	0,150	0,140	0,500
49	0,890	1,060	0,037	5,590	5,820	>0,999	0,180	0,180	>0,9999
50	1,110	1,060	0,385	6,220	6,550	0,362	0,180	0,210	0,168
51	0,880	1,000	0,176	5,400	5,840	0,425	0,140	0,160	0,563
52	1,060	1,060	0,699	5,210	6,090	0,178	0,150	0,210	0,028
54	0,980	1,050	0,325	6,080	6,340	0,083	0,200	0,180	0,500
55	0,940	0,980	0,705	6,020	5,950	0,764	0,170	0,150	0,312
56	1,060	1,110	0,504	6,800	7,010	0,135	0,160	0,180	0,746
57	0,930	1,150	0,126	5,700	6,250	0,205	0,160	0,170	0,831
58	0,940	0,940	>0,9999	5,610	5,400	0,353	0,160	0,190	0,344
59	0,880	1,020	0,102	5,810	5,770	0,755	0,170	0,190	0,500
60	0,900	0,950	0,170	5,910	5,540	0,526	0,180	0,140	0,089
61	1,060	1,000	0,049	6,710	6,040	0,178	0,160	0,190	0,293
62	1,010	1,080	0,089	6,520	6,760	0,095	0,180	0,220	0,030
63	1,000	1,040	0,560	6,000	6,290	0,153	0,140	0,190	0,072
64	1,090	0,970	0,232	6,740	6,610	0,669	0,160	0,200	0,216
65	1,020	1,060	0,592	5,750	6,010	0,257	0,220	0,170	0,242
66	0,990	1,000	0,776	6,230	6,050	0,663	0,170	0,170	0,860
67	0,970	0,960	0,293	6,060	5,930	0,535	0,180	0,160	0,126
68	0,940	0,970	0,486	5,700	6,060	0,193	0,170	0,170	0,500
72	1,040	1,020	0,592	6,130	6,250	0,691	0,160	0,190	0,486
73	1,080	0,990	0,459	6,370	6,360	0,922	0,150	0,210	0,058
75	0,930	0,890	0,480	6,210	6,430	0,417	0,140	0,180	0,161
76	1,070	1,010	0,168	6,250	6,610	0,529	0,160	0,190	0,051
77	1,020	0,970	0,349	6,030	6,060	0,931	0,170	0,190	0,155
78	1,000	0,980	0,808	6,710	6,770	0,880	0,160	0,160	0,500
79	1,000	1,020	0,801	5,660	6,240	0,273	0,170	0,210	0,258
80	0,870	0,960	0,390	5,410	5,830	0,509	0,170	0,150	0,106
81	0,890	0,980	0,255	5,790	6,520	0,398	0,170	0,150	0,205
82	0,990	1,020	0,360	5,490	6,500	0,194	0,180	0,180	0,500
84	1,010	1,050	0,465	6,060	6,680	0,049	0,110	0,180	0,010
86	0,900	1,000	0,352	5,620	6,100	0,267	0,170	0,180	0,910
87	0,920	0,930	0,918	6,200	5,690	0,082	0,170	0,150	0,493
88	0,920	0,920	0,795	6,610	6,570	0,899	0,170	0,160	0,758
89	0,890	0,970	0,170	5,010	6,150	0,221	0,180	0,180	>0,9999
90	1,060	1,100	0,375	7,100	7,390	0,438	0,140	0,190	0,130
91	1,050	1,040	0,901	6,740	6,400	0,308	0,160	0,170	0,699
92	0,910	0,970	0,093	5,720	6,100	0,615	0,160	0,170	0,592
93	0,930	1,080	0,020	5,620	6,350	0,044	0,220	0,180	0,333
95	0,950	1,050	0,011	6,200	6,590	0,433	0,180	0,170	0,684
96	1,030	1,040	0,948	6,110	6,250	0,383	0,240	0,230	>0,9999
98	0,920	0,960	0,705	6,330	6,480	0,664	0,210	0,170	0,070
99	1,110	1,030	0,079	6,400	6,340	0,859	0,170	0,210	0,214
102	1,020	0,980	0,556	6,300	6,220	0,545	0,160	0,200	0,297

105	0,920	0,970	0,543	6,080	6,390	0,393	0,150	0,190	0,106
111	0,860	0,970	0,102	5,390	5,910	0,201	0,210	0,160	0,058
113	0,980	0,980	>0,9999	6,250	6,430	0,696	0,180	0,170	0,592
114	0,980	1,100	0,159	6,590	6,890	0,622	0,150	0,180	0,312
115	1,000	0,970	0,406	6,280	6,340	0,825	0,170	0,190	0,155
118	0,990	1,170	0,177	6,350	7,180	0,161	0,170	0,180	0,293
119	0,990	1,110	0,308	6,180	6,520	0,339	0,160	0,180	0,155
120	0,890	1,000	0,039	5,700	5,940	0,037	0,180	0,170	0,804
121	1,020	1,040	0,865	6,260	6,190	0,938	0,200	0,190	0,592
122	0,960	1,040	0,477	5,680	6,460	0,068	0,170	0,210	0,090
123	1,040	1,030	0,634	5,270	6,110	0,053	0,180	0,160	0,333
124	0,860	1,030	0,090	6,260	6,640	0,170	0,140	0,170	0,205
125	1,020	1,040	0,500	6,140	6,040	0,819	0,180	0,200	0,445
126	0,930	1,090	0,036	5,910	6,100	0,588	0,180	0,170	0,910
127	1,100	1,030	0,552	6,190	5,910	0,248	0,150	0,200	0,130
128	1,040	1,080	0,295	5,900	6,310	0,298	0,160	0,200	0,410
130	1,070	1,030	0,369	6,210	6,120	0,054	0,160	0,200	0,232
131	1,190	1,060	0,023	6,110	5,890	0,367	0,100	0,210	0,057
132	0,840	1,010	0,027	5,770	6,260	0,331	0,210	0,190	0,500
133	1,060	1,020	0,470	6,420	6,330	0,713	0,120	0,180	0,198
134	0,960	1,020	0,312	5,850	5,850	>0,9999	0,200	0,170	0,155
135	0,720	0,930	0,061	5,120	5,310	0,503	0,160	0,150	0,500
136	0,900	1,010	0,039	6,140	5,950	0,720	0,190	0,190	0,895
137	0,920	1,000	0,108	6,340	5,980	0,213	0,180	0,190	0,705
138	1,040	1,090	0,473	6,310	6,090	0,398	0,130	0,200	0,047
140	0,980	1,040	0,486	5,880	6,240	0,449	0,160	0,180	0,543

Tabla 30. Valores de χ^2 obtenidos para los marcadores moleculares.

<i>Locus</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>-</i>	χ^2	<i>GL</i>	<i>Significancia</i>	<i>Clasificación</i>
AA160	15	36	25	0	0	11	2,84	2	-	[a:h:b]
AA205	15	37	27	0	0	8	3,96	2	-	[a:h:b]
AA278	17	39	22	0	0	9	0,64	2	-	[a:h:b]
AA355	9	39	21	0	0	18	5,35	2	*	[a:h:b]
AB23	27	35	12	0	0	13	6,30	2	**	[a:h:b]
AC58	24	41	13	0	0	9	3,31	2	-	[a:h:b]
AD147	12	30	14	0	0	31	0,43	2	-	[a:h:b]
AD56	21	44	14	0	0	8	2,27	2	-	[a:h:b]
AD61	23	34	22	0	0	8	1,56	2	-	[a:h:b]
D21	18	44	17	0	0	8	1,05	2	-	[a:h:b]
Me10-Em10.220	6	0	0	67	0	14	2,00	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em10.590	24	0	0	42	0	21	4,55	1	**	[a:h+b+c]
Me10-Em10.605	10	0	0	65	0	12	5,44	1	**	[a:h+b+c]
Me10-Em10.700	16	0	0	57	0	14	0,37	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em10.705	0	0	22	0	56	9	0,43	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em10.780	0	0	12	0	62	13	3,05	1	*	[a+h+d:b]
Me10-Em10.805	18	0	0	58	0	11	0,07	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em6.120	20	0	0	53	0	14	0,22	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em6.125	21	0	0	54	0	12	0,36	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em6.170	42	0	0	32	0	13	39,80	1	*****	[a:h+b+c]
Me10-Em6.173	43	0	0	34	0	10	39,07	1	*****	[a:h+b+c]
Me10-Em6.175	0	0	55	0	22	10	88,52	1	*****	[a+h+d:b]
Me10-Em6.177	68	0	0	9	0	10	164,61	1	*****	[a:h+b+c]
Me10-Em6.265	0	0	26	0	48	13	4,05	1	**	[a+h+d:b]
Me10-Em6.290	11	0	0	67	0	9	4,94	1	**	[a:h+b+c]
Me10-Em6.385	20	0	0	61	0	6	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em6.395	21	0	0	58	0	8	0,11	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em6.405	0	0	22	0	53	12	0,75	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em6.420	0	0	18	0	49	20	0,12	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em6.470	0	0	70	0	11	6	162,97	1	*****	[a+h+d:b]
Me10-Em6.500	13	0	0	67	0	7	3,27	1	*	[a:h+b+c]
Me10-Em6.530	28	0	0	49	0	10	5,30	1	**	[a:h+b+c]
Me10-Em6.600	0	0	14	0	60	13	1,46	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em7.225	0	0	22	0	56	9	0,43	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em7.260	3	0	0	73	0	11	1,00	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em7.270	13	0	0	65	0	9	2,89	1	*	[a:h+b+c]
Me10-Em7.340	0	0	15	0	64	8	1,52	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em7.370	7	0	0	68	0	12	9,82	1	****	[a:h+b+c]

Me10-Em7.510	0	0	10	0	67	10	5,93	1	**	[a+h+d:b]
Me10-Em8.150	0	0	27	0	46	14	5,59	1	**	[a+h+d:b]
Me10-Em8.175	13	0	0	58	0	16	1,69	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em8.415	4	0	0	66	0	17	1,33	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em8.530	0	0	18	0	52	17	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em8.570	0	0	12	0	62	13	3,05	1	*	[a+h+d:b]
Me10-Em8.580	5	0	0	71	0	11	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em9.110	0	0	24	0	56	7	1,07	1	-	[a+h+d:b]
Me10-Em9.350	32	0	0	44	0	11	11,86	1	*****	[a:h+b+c]
Me10-Em9.520	16	0	0	62	0	9	0,84	1	-	[a:h+b+c]
Me10-Em9.600	21	0	0	53	0	13	0,45	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em2.1000	0	0	14	0	52	21	0,51	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em2.1020	15	0	0	50	0	22	0,13	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em2.270	0	0	11	0	54	22	2,26	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em2.385	0	0	25	0	44	18	4,64	1	**	[a+h+d:b]
Me1-Em2.585	19	0	0	49	0	19	0,31	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em2.587	17	0	0	45	0	25	0,19	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em2.700	0	0	23	0	37	27	5,69	1	**	[a+h+d:b]
Me1-Em2.720	4	0	0	60	0	23	1,33	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em2.800	2	0	0	59	0	26	0,67	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em3.280	0	0	32	0	40	15	14,52	1	*****	[a+h+d:b]
Me1-Em3.285	13	0	0	58	0	16	1,69	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em3.300	0	0	21	0	49	17	0,93	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em3.350	0	0	60	0	15	12	121,00	1	*****	[a+h+d:b]
Me1-Em3.600	64	0	0	14	0	9	135,40	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em3.625	11	0	0	64	0	12	4,27	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em3.670	0	0	64	0	12	11	142,11	1	*****	[a+h+d:b]
Me1-Em3.700	23	0	0	55	0	9	0,84	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em3.710	14	0	0	61	0	12	1,60	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em3.750	10	0	0	62	0	15	4,74	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em3.780	0	0	27	0	38	22	9,48	1	****	[a+h+d:b]
Me1-Em3.820	0	0	17	0	54	16	0,04	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em4.160	16	0	0	54	0	17	0,17	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em4.195	0	0	24	0	51	12	1,96	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em4.210	22	0	0	45	0	20	2,19	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em4.225	6	0	0	66	0	15	10,67	1	****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.255	43	0	0	33	0	11	40,42	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.265	57	0	0	19	0	11	101,33	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.285	45	0	0	29	0	13	50,61	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.287	62	0	0	12	0	13	136,38	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.290	57	0	0	16	0	14	109,70	1	*****	[a:h+b+c]

Me1-Em4.335	44	0	0	28	0	15	50,07	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.340	42	0	0	28	0	17	45,73	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.345	43	0	0	25	0	19	53,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.350	49	0	0	19	0	19	80,31	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.410	55	0	0	20	0	12	93,44	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.430	37	0	0	31	0	19	31,37	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.450	63	0	0	13	0	11	135,86	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em4.532	12	0	0	45	0	30	0,47	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em4.537	5	0	0	67	0	15	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em4.545	18	0	0	48	0	21	0,18	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em4.570	25	0	0	45	0	17	4,29	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em4.600	10	0	0	53	0	24	2,80	1	*	[a:h+b+c]
Me1-Em4.605	28	0	0	38	0	21	10,69	1	****	[a:h+b+c]
Me1-Em5.240	50	0	0	21	0	16	78,13	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em5.255	23	0	0	51	0	13	1,46	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em5.280	0	0	17	0	39	31	0,86	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em5.290	27	0	0	47	0	13	5,21	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em5.293	0	0	57	0	17	13	106,83	1	*****	[a+h+d:b]
Me1-Em5.300	9	0	0	66	0	12	6,76	1	***	[a:h+b+c]
Me1-Em5.330	20	0	0	45	0	22	1,15	1	-	[a:h+b+c]
Me1-Em5.335	0	0	24	0	38	25	6,22	1	**	[a+h+d:b]
Me1-Em5.395	0	0	18	0	52	17	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me1-Em5.425	10	0	0	61	0	16	4,51	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em5.450	10	0	0	67	0	10	5,93	1	**	[a:h+b+c]
Me1-Em5.452	30	0	0	42	0	15	10,67	1	****	[a:h+b+c]
Me1-Em5.490	36	0	0	39	0	12	21,16	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em5.500	71	0	0	5	0	11	189,75	1	*****	[a:h+b+c]
Me1-Em5.525	48	0	0	24	0	15	66,67	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.500	0	0	32	0	45	10	11,26	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.505	34	0	0	38	0	15	18,96	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.510	36	0	0	24	0	27	39,20	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.512	0	0	16	0	52	19	0,08	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em1.515	0	0	53	0	15	19	101,65	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.520	21	0	0	38	0	28	3,53	1	*	[a:h+b+c]
Me2-Em1.525	0	0	24	0	41	22	4,93	1	**	[a+h+d:b]
Me2-Em1.527	0	0	18	0	51	18	0,04	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em1.535	41	0	0	31	0	15	39,19	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.538	17	0	0	36	0	34	1,42	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em1.540	15	0	0	38	0	34	0,31	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em1.543	23	0	0	39	0	25	4,84	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em1.545	22	0	0	38	0	27	4,36	1	**	[a:h+b+c]

Me2-Em1.548	32	0	0	41	0	14	13,81	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.555	14	0	0	58	0	15	1,19	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em1.557	27	0	0	46	0	14	5,59	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em1.560	32	0	0	38	0	17	16,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.565	24	0	0	45	0	18	3,52	1	*	[a:h+b+c]
Me2-Em1.583	0	0	42	0	35	10	35,85	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.585	0	0	48	0	27	12	60,84	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.587	0	0	49	0	23	15	71,19	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.590	0	0	43	0	27	17	49,54	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em1.592	35	0	0	43	0	9	16,43	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.594	45	0	0	24	0	18	59,52	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.595	40	0	0	29	0	18	40,00	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.605	25	0	0	42	0	20	5,42	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em1.635	21	0	0	50	0	16	0,79	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em1.680	34	0	0	39	0	14	18,12	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.685	30	0	0	42	0	15	10,67	1	****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.690	40	0	0	33	0	14	34,56	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.830	45	0	0	31	0	11	47,44	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em1.850	17	0	0	54	0	16	0,04	1	-	[a:h+b+c]
Me-2Em2.300	20	0	0	52	0	15	0,30	1	-	[a:h+b+c]
Me-2Em2.555	0	0	15	0	32	40	1,20	1	-	[a+h+d:b]
Me-2Em2.610	0	0	65	0	10	12	152,11	1	*****	[a+h+d:b]
Me-2Em2.625	14	0	0	49	0	24	0,26	1	-	[a:h+b+c]
Me-2Em2.665	0	0	6	0	67	14	10,96	1	*****	[a+h+d:b]
Me-2Em2.685	12	0	0	60	0	15	2,67	1	-	[a:h+b+c]
Me-2Em2.762	0	0	14	0	33	40	0,57	1	-	[a+h+d:b]
Me-2Em2.960	12	0	0	55	0	20	1,80	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.295	12	0	0	57	0	18	2,13	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.325	16	0	0	55	0	16	0,23	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.385	30	0	0	43	0	14	10,09	1	****	[a:h+b+c]
Me2-Em3.615	0	0	6	0	71	10	2,00	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.720	20	0	0	44	0	23	1,33	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.780	15	0	0	59	0	13	0,88	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em3.790	0	0	63	0	11	13	142,72	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em3.830	0	0	18	0	51	18	0,04	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em4.1200	0	0	12	0	53	22	1,48	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em4.220	0	0	59	0	17	11	112,28	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em4.380	0	0	67	0	10	10	157,93	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em4.420	0	0	52	0	25	10	74,29	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em4.500	58	0	0	13	0	16	121,69	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em4.658	0	0	50	0	25	12	69,44	1	*****	[a+h+d:b]

Me2-Em4.660	20	0	0	51	0	16	0,38	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em4.695	0	0	49	0	24	14	69,08	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em4.697	16	0	0	60	0	11	0,63	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em4.800	0	0	48	0	28	11	59,02	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em4.830	0	0	22	0	37	28	4,75	1	**	[a+h+d:b]
Me2-Em4.870	0	0	15	0	52	20	0,24	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em4.890	0	0	32	0	43	12	12,48	1	*****	[a+h+d:b]
Me2-Em5.203	27	0	0	46	0	14	5,59	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em5.205	10	0	0	64	0	13	5,21	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em5.245	31	0	0	36	0	20	16,16	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.250	12	0	0	62	0	13	3,05	1	*	[a:h+b+c]
Me2-Em5.290	14	0	0	62	0	11	1,75	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em5.330	60	0	0	8	0	19	145,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.333	56	0	0	13	0	18	116,06	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.343	6	0	0	67	0	14	2,00	1	-	[a+h+d:b]
Me2-Em5.345	7	0	0	65	0	15	8,96	1	****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.348	33	0	0	30	0	24	25,19	1	*****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.350	0	0	28	0	44	15	7,41	1	***	[a+h+d:b]
Me2-Em5.360	15	0	0	57	0	15	0,67	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em5.470	16	0	0	61	0	10	0,73	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em5.480	8	0	0	68	0	11	8,49	1	****	[a:h+b+c]
Me2-Em5.540	26	0	0	45	0	16	5,11	1	**	[a:h+b+c]
Me2-Em5.545	19	0	0	49	0	19	0,31	1	-	[a:h+b+c]
Me2-Em5.600	10	0	0	65	0	12	5,44	1	**	[a:h+b+c]
Me3-Em1.600	9	0	0	61	0	17	5,50	1	**	[a:h+b+c]
Me3-Em1.630	4	0	0	70	0	13	1,33	1	-	[a+h+d:b]
Me3-Em1.640	61	0	0	15	0	11	123,79	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em1.660	67	0	0	9	0	11	161,68	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em2.530	0	0	34	0	41	12	16,54	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.540	0	0	8	0	70	9	9,04	1	****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.620	0	0	6	0	71	10	2,00	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em2.715	0	0	44	0	30	13	46,86	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.750	0	0	23	0	49	15	1,85	1	-	[a+h+d:b]
Me3-Em2.775	0	0	37	0	39	11	22,74	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.795	0	0	21	0	50	16	0,79	1	-	[a+h+d:b]
Me3-Em2.805	0	0	35	0	43	9	16,43	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.815	19	0	0	51	0	17	0,17	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em2.820	0	0	10	0	64	13	5,21	1	**	[a+h+d:b]
Me3-Em2.825	19	0	0	51	0	17	0,17	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em2.830	0	0	32	0	38	17	16,02	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em2.850	0	0	26	0	33	28	11,44	1	*****	[a+h+d:b]

Me3-Em3.395	23	0	0	35	0	29	6,64	1	***	[a:h+b+c]
Me3-Em3.400	14	0	0	49	0	24	0,26	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em3.410	0	0	46	0	20	21	70,32	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em3.420	20	0	0	42	0	25	1,74	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em3.645	0	0	55	0	13	19	113,25	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em3.650	13	0	0	53	0	21	0,99	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em3.665	0	0	19	0	43	25	1,05	1	-	[a+h+d:b]
Me3-Em3.672	13	0	0	43	0	31	0,10	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em3.685	0	0	63	0	7	17	157,73	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em3.830	0	0	16	0	53	18	0,12	1	-	[a+h+d:b]
Me3-Em3.875	6	0	0	54	0	27	7,20	1	***	[a:h+b+c]
Me3-Em4.515	0	0	54	0	17	16	98,71	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em4.545	42	0	0	33	0	12	38,44	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em4.578	0	0	37	0	40	10	21,82	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em4.585	0	0	31	0	32	24	19,69	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em4.625	14	0	0	59	0	14	1,32	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em4.655	0	0	39	0	26	22	42,47	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em4.660	0	0	7	0	64	16	8,68	1	****	[a+h+d:b]
Me3-Em5.270	58	0	0	19	0	10	104,00	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.400	74	0	0	8	0	5	186,16	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.600	43	0	0	31	0	13	43,26	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.630	22	0	0	56	0	9	0,43	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em5.660	29	0	0	50	0	8	5,78	1	**	[a:h+b+c]
Me3-Em5.685	74	0	0	8	0	5	186,16	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.70	24	0	0	52	0	11	1,75	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em5.810	76	0	0	6	0	5	200,34	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.895	62	0	0	20	0	5	112,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.900	18	0	0	61	0	8	0,21	1	-	[a:h+b+c]
Me3-Em5.910	0	0	65	0	16	6	131,86	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em5.920	67	0	0	15	0	5	140,63	1	*****	[a:h+b+c]
Me3-Em5.940	0	0	49	0	26	12	65,07	1	*****	[a+h+d:b]
Me3-Em5.950	0	0	33	0	42	12	14,44	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em2.440	0	0	10	0	66	11	5,68	1	**	[a+h+d:b]
Me4-Em2.503	0	0	6	0	66	15	2,00	1	-	[a:h+b+c]
Me4-Em2.530	2	0	0	71	0	14	0,67	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em2.543	8	0	0	69	0	10	8,77	1	****	[a:h+b+c]
Me4-Em2.557	4	0	0	71	0	12	1,33	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em2.562	11	0	0	65	0	11	4,49	1	**	[a:h+b+c]
Me4-Em2.575	0	0	12	0	47	28	0,68	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em2.578	0	0	9	0	51	27	3,20	1	*	[a+h+d:b]
Me4-Em2.580	0	0	16	0	63	8	0,95	1	-	[a+h+d:b]

Me4-Em2.593	0	0	31	0	46	10	9,56	1	****	[a+h+d:b]
Me4-Em2.5d8	0	0	67	0	12	8	150,72	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em2.635	7	0	0	71	0	9	2,33	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em3.225	43	0	0	23	0	21	56,75	1	*****	[a:h+b+c]
Me4-Em3.260	0	0	11	0	64	12	4,27	1	**	[a+h+d:b]
Me4-Em3.275	0	0	50	0	19	18	82,90	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em3.310	30	0	0	42	0	15	10,67	1	****	[a:h+b+c]
Me4-Em3.360	0	0	24	0	43	20	4,18	1	**	[a+h+d:b]
Me4-Em3.380	0	0	26	0	45	16	5,11	1	**	[a+h+d:b]
Me4-Em3.420	0	0	20	0	52	15	0,30	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em3.450	0	0	25	0	49	13	3,05	1	*	[a+h+d:b]
Me4-Em3.470	0	0	8	0	69	10	8,77	1	****	[a+h+d:b]
Me4-Em3.530	0	0	49	0	22	16	73,36	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em3.550	0	0	39	0	34	14	31,46	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em3.575	0	0	9	0	36	42	0,60	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em4.570	14	0	0	53	0	20	0,60	1	-	[a:h+b+c]
Me4-Em4.630	35	0	0	34	0	18	24,35	1	*****	[a:h+b+c]
Me4-Em4.637	17	0	0	52	0	18	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me4-Em4.675	5	0	0	62	0	20	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em4.683	15	0	0	52	0	20	0,24	1	-	[a:h+b+c]
Me4-Em4.730	25	0	0	39	0	23	6,75	1	***	[a:h+b+c]
Me4-Em4.760	9	0	0	63	0	15	6,00	1	**	[a:h+b+c]
Me4-Em4.775	1	0	0	72	0	14	0,33	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em4.850	57	0	0	17	0	13	106,83	1	*****	[a:h+b+c]
Me4-Em4.865	15	0	0	53	0	19	0,31	1	-	[a:h+b+c]
Me4-Em5.660	0	0	15	0	69	3	2,29	1	-	[a+h+d:b]
Me4-Em5.680	0	0	27	0	48	12	4,84	1	**	[a+h+d:b]
Me4-Em5.690	0	0	71	0	13	3	158,73	1	*****	[a+h+d:b]
Me4-Em5.715	0	0	29	0	50	8	5,78	1	**	[a+h+d:b]
Me5-Em2.1050	0	0	21	0	48	18	1,09	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em2.460	39	0	0	33	0	15	32,67	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.470	32	0	0	34	0	21	19,41	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.490	30	0	0	39	0	18	12,57	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.525	26	0	0	47	0	14	4,39	1	**	[a:h+b+c]
Me5-Em2.530	29	0	0	43	0	15	8,96	1	****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.600	0	0	45	0	27	15	54,00	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.605	0	0	60	0	18	9	112,15	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.610	67	0	0	11	0	9	154,27	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.615	0	0	69	0	8	10	171,43	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.618	0	0	58	0	15	14	115,44	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.621	22	0	0	48	0	17	1,54	1	-	[a:h+b+c]

Me5-Em2.624	36	0	0	37	0	14	23,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.627	69	0	0	7	0	11	175,44	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.630	28	0	0	45	0	14	6,95	1	***	[a:h+b+c]
Me5-Em2.640	60	0	0	17	0	10	115,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.650	57	0	0	19	0	11	101,33	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.660	22	0	0	44	0	21	2,44	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em2.670	0	0	28	0	41	18	8,93	1	****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.680	0	0	34	0	39	14	18,12	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.685	24	0	0	45	0	18	3,52	1	*	[a:h+b+c]
Me5-Em2.698	60	0	0	15	0	12	121,00	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.700	25	0	0	48	0	14	3,33	1	*	[a:h+b+c]
Me5-Em2.715	0	0	48	0	21	18	73,09	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em2.730	30	0	0	48	0	9	7,54	1	***	[a:h+b+c]
Me5-Em2.735	13	0	0	60	0	14	2,01	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em2.745	10	0	0	68	0	9	6,17	1	**	[a:h+b+c]
Me5-Em2.750	17	0	0	61	0	9	0,43	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em2.755	38	0	0	36	0	13	27,41	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em2.772	0	0	19	0	53	15	0,07	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em2.820	18	0	0	51	0	18	0,04	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em2.900	19	0	0	57	0	11	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em2.980	47	0	0	29	0	11	55,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em3.200	50	0	0	10	0	27	108,89	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em3.485	5	0	0	47	0	35	6,56	1	**	[a:h+b+c]
Me5-Em3.585	5	0	0	65	0	17	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em3.598	28	0	0	38	0	21	10,69	1	****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.255	0	0	27	0	31	29	14,37	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.355	28	0	0	35	0	24	12,70	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.365	29	0	0	31	0	27	17,42	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.410	29	0	0	33	0	25	15,68	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.490	0	0	35	0	14	38	56,33	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.495	0	0	34	0	22	31	38,10	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.530	0	0	23	0	40	24	4,45	1	**	[a+h+d:b]
Me5-Em4.554	0	0	30	0	27	30	23,21	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.558	0	0	45	0	12	30	88,47	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.570	0	0	23	0	37	27	5,69	1	**	[a+h+d:b]
Me5-Em4.601	0	0	11	0	51	25	1,74	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em4.602	41	0	0	19	0	27	60,09	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.603	0	0	51	0	11	25	108,41	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.604	46	0	0	14	0	27	85,42	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.608	0	0	40	0	24	23	48,00	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.618	7	0	0	57	0	23	6,75	1	***	[a:h+b+c]

Me5-Em4.622	0	0	56	0	11	20	122,63	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.626	55	0	0	12	0	20	116,46	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.627	48	0	0	19	0	20	77,74	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.628	0	0	48	0	18	21	80,18	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.629	0	0	44	0	22	21	61,11	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.631	21	0	0	42	0	24	2,33	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em4.632	21	0	0	42	0	24	2,33	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em4.633	0	0	48	0	17	22	82,71	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.634	0	0	50	0	10	27	108,89	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.636	0	0	59	0	5	23	154,08	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.637	41	0	0	20	0	26	57,97	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.638	55	0	0	8	0	24	130,42	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.640	47	0	0	13	0	27	91,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.641	51	0	0	12	0	24	105,19	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.651	23	0	0	40	0	24	4,45	1	**	[a:h+b+c]
Me5-Em4.653	21	0	0	41	0	25	2,60	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em4.655	0	0	49	0	15	23	90,75	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.656	57	0	0	10	0	20	128,96	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.657	48	0	0	19	0	20	77,74	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.658	0	0	55	0	10	22	123,21	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.660	35	0	0	29	0	23	30,08	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.662	36	0	0	28	0	23	33,33	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.675	12	0	0	52	0	23	1,33	1	-	[a:h+b+c]
Me5-Em4.676	0	0	50	0	13	24	99,31	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.679	0	0	41	0	22	24	53,97	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.681	0	0	47	0	18	22	77,58	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.685	25	0	0	30	0	32	12,27	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.687	46	0	0	19	0	22	72,62	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.689	45	0	0	17	0	25	74,86	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.691	0	0	54	0	11	22	116,93	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.698	23	0	0	38	0	26	5,25	1	**	[a:h+b+c]
Me5-Em4.730	0	0	37	0	26	24	38,23	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.750	51	0	0	10	0	26	111,74	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em4.807	0	0	54	0	11	22	116,93	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em4.810	51	0	0	13	0	23	102,08	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.205	11	0	0	59	0	17	3,22	1	*	[a:h+b+c]
Me5-Em5.225	0	0	22	0	47	18	1,74	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em5.230	0	0	19	0	50	18	0,24	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em5.250	0	0	65	0	12	10	144,97	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em5.255	32	0	0	41	0	14	13,81	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.265	62	0	0	15	0	10	126,58	1	*****	[a:h+b+c]

Me5-Em5.272	0	0	66	0	11	10	151,38	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em5.278	58	0	0	18	0	11	106,74	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.283	0	0	54	0	20	13	90,83	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em5.297	0	0	16	0	59	12	0,54	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em5.298	65	0	0	10	0	12	152,11	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.330	12	0	0	65	0	10	3,64	1	*	[a:h+b+c]
Me5-Em5.333	0	0	41	0	32	14	37,81	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em5.350	57	0	0	18	0	12	104,04	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.380	30	0	0	45	0	12	9,00	1	****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.3d0	0	0	17	0	53	17	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em5.400	0	0	18	0	57	12	0,04	1	-	[a+h+d:b]
Me5-Em5.450	38	0	0	26	0	23	40,33	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.460	0	0	27	0	44	16	6,43	1	**	[a+h+d:b]
Me5-Em5.4d0	0	0	41	0	26	20	46,81	1	*****	[a+h+d:b]
Me5-Em5.500	33	0	0	38	0	16	17,47	1	*****	[a:h+b+c]
Me5-Em5.595	12	0	0	63	0	12	3,24	1	*	[a:h+b+c]
Me5-Em5.600	9	0	0	67	0	11	7,02	1	***	[a:h+b+c]
Me5-Em5.605	34	0	0	38	0	15	18,96	1	*****	[a:h+b+c]
Me6-Em6.620	14	0	0	65	0	8	2,23	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em6.680	0	0	18	0	61	8	0,21	1	-	[a+h+d:b]
Me6-Em6.730	8	0	0	72	0	7	9,60	1	****	[a:h+b+c]
Me6-Em7.410	0	0	21	0	61	5	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me6-Em7.450	13	0	0	65	0	9	2,89	1	*	[a:h+b+c]
Me6-Em7.540	25	0	0	53	0	9	2,07	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em7.570	15	0	0	61	0	11	1,12	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em7.610	0	0	5	0	71	11	1,67	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em7.675	0	0	8	0	72	7	9,60	1	****	[a+h+d:b]
Me6-Em8.210	27	0	0	56	0	4	2,51	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em8.260	17	0	0	51	0	19	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em8.540	18	0	0	63	0	6	0,33	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em8.655	12	0	0	65	0	10	3,64	1	*	[a:h+b+c]
Me6-Em8.800	0	0	46	0	37	4	40,97	1	*****	[a+h+d:b]
Me6-Em8.830	0	0	22	0	54	11	0,63	1	-	[a+h+d:b]
Me6-Em8.835	9	0	0	70	0	8	7,80	1	***	[a:h+b+c]
Me6-Em8.840	12	0	0	71	0	4	4,92	1	**	[a:h+b+c]
Me6-Em9.440	8	0	0	75	0	4	10,45	1	****	[a:h+b+c]
Me6-Em9.610	21	0	0	52	0	14	0,55	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em9.625	0	0	24	0	46	17	3,22	1	*	[a+h+d:b]
Me6-Em9.650	15	0	0	61	0	11	1,12	1	-	[a:h+b+c]
Me6-Em9.670	0	0	20	0	58	9	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me6-Em9.673	16	0	0	66	0	5	1,32	1	-	[a:h+b+c]

Me6-Em9.675	0	0	25	0	56	6	1,49	1	-	[a+h+d:b]
Me6-Em9.687	14	0	0	66	0	7	2,40	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em6.290	7	0	0	68	0	12	9,82	1	****	[a:h+b+c]
Me7-Em6.620	19	0	0	56	0	12	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em6.682	0	0	26	0	53	8	2,64	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em6.687	0	0	21	0	56	10	0,21	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em6.690	0	0	7	0	68	12	9,82	1	****	[a+h+d:b]
Me7-Em6.692	0	0	7	0	69	11	10,11	1	****	[a+h+d:b]
Me7-Em6.695	0	0	10	0	70	7	6,67	1	***	[a+h+d:b]
Me7-Em6.697	11	0	0	63	0	13	4,05	1	**	[a:h+b+c]
Me7-Em6.700	0	0	5	0	75	7	1,67	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em7.570	0	0	26	0	49	12	3,74	1	*	[a+h+d:b]
Me7-Em7.630	0	0	29	0	50	8	5,78	1	**	[a+h+d:b]
Me7-Em7.640	0	0	17	0	64	6	0,70	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em7.660	0	0	17	0	64	6	0,70	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em7.700	0	0	15	0	57	15	0,67	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em8.240	17	0	0	65	0	5	0,80	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em8.260	14	0	0	63	0	10	1,91	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em8.265	0	0	26	0	56	5	1,97	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em8.280	0	0	71	0	11	5	165,87	1	*****	[a+h+d:b]
Me7-Em8.295	0	0	3	0	78	6	1,00	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em8.300	0	0	9	0	66	12	6,76	1	***	[a+h+d:b]
Me7-Em8.305	20	0	0	58	0	9	0,02	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em8.340	0	0	18	0	62	7	0,27	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em8.375	0	0	10	0	71	6	6,92	1	***	[a+h+d:b]
Me7-Em8.380	6	0	0	74	0	7	2,00	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em8.405	0	0	18	0	64	5	0,41	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em8.440	15	0	0	56	0	16	0,57	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em8.620	10	0	0	72	0	5	7,17	1	***	[a:h+b+c]
Me7-Em8.668	42	0	0	26	0	19	49,02	1	*****	[a:h+b+c]
Me7-Em8.680	0	0	8	0	72	7	9,60	1	****	[a+h+d:b]
Me7-Em9.270	0	0	39	0	35	13	30,29	1	*****	[a+h+d:b]
Me7-Em9.275	0	0	12	0	60	15	2,67	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em9.300	14	0	0	65	0	8	2,23	1	-	[a:h+b+c]
Me7-Em9.350	0	0	17	0	49	21	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em9.370	34	0	0	43	0	10	15,07	1	*****	[a:h+b+c]
Me7-Em9.450	0	0	12	0	62	13	3,05	1	*	[a+h+d:b]
Me7-Em9.470	0	0	22	0	58	7	0,27	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em9.520	0	0	46	0	25	16	59,95	1	*****	[a+h+d:b]
Me7-Em9.525	0	0	33	0	44	10	13,10	1	*****	[a+h+d:b]
Me7-Em9.535	47	0	0	27	0	13	58,54	1	*****	[a:h+b+c]

Me7-Em9.545	0	0	24	0	51	12	1,96	1	-	[a+h+d:b]
Me7-Em9.560	32	0	0	51	0	4	8,13	1	****	[a:h+b+c]
Me7-Em9.565	0	0	34	0	48	5	11,85	1	*****	[a+h+d:b]
Me7-Em9.575	47	0	0	32	0	8	50,13	1	*****	[a:h+b+c]
Me8-Em6.238	23	0	0	58	0	6	0,50	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em6.240	59	0	0	22	0	6	98,87	1	*****	[a:h+b+c]
Me8-Em6.250	0	0	0	74	0	13	24,67	1	*****	[a:h+b+c]
Me8-Em6.255	21	0	0	62	0	4	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em6.298	0	0	73	0	11	3	171,68	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em6.300	5	0	0	78	0	4	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em6.420	0	0	19	0	57	11	0,00	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em6.510	0	0	37	0	24	26	41,36	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em6.512	16	0	0	56	0	15	0,30	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em6.515	9	0	0	73	0	5	8,60	1	****	[a:h+b+c]
Me8-Em6.630	15	0	0	61	0	11	1,12	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em6.655	14	0	0	63	0	10	1,91	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em6.668	0	0	0	69	0	18	23,00	1	*****	[a:h+b+c]
Me8-Em6.688	9	0	0	70	0	8	7,80	1	***	[a:h+b+c]
Me8-Em6.692	13	0	0	68	0	6	3,46	1	*	[a:h+b+c]
Me8-Em6.805	24	0	0	50	0	13	2,18	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em7.560	0	0	29	0	54	4	4,37	1	**	[a+h+d:b]
Me8-Em7.608	0	0	7	0	77	3	2,33	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em7.641	21	0	0	60	0	6	0,04	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em7.649	26	0	0	58	0	3	1,59	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em7.666	0	0	25	0	54	8	1,86	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em7.674	0	0	18	0	60	9	0,15	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em7.693	20	0	0	56	0	11	0,07	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em7.860	0	0	18	0	63	6	0,33	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em8.235	0	0	47	0	33	7	48,60	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em8.240	0	0	42	0	35	10	35,85	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em8.250	0	0	73	0	10	4	175,43	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em8.500	0	0	62	0	19	6	114,77	1	*****	[a+h+d:b]
Me8-Em8.505	12	0	0	69	0	6	4,48	1	**	[a:h+b+c]
Me8-Em8.635	19	0	0	61	0	7	0,07	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em8.685	18	0	0	54	0	15	0,00	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em8.690	11	0	0	67	0	9	4,94	1	**	[a:h+b+c]
Me8-Em9.1000	23	0	0	54	0	10	0,97	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em9.235	28	0	0	50	0	9	4,94	1	**	[a:h+b+c]
Me8-Em9.250	5	0	0	68	0	14	1,67	1	-	[a+h+d:b]
Me8-Em9.275	13	0	0	63	0	11	2,53	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em9.280	13	0	0	64	0	10	2,71	1	-	[a:h+b+c]

Me8-Em9.285	16	0	0	59	0	12	0,54	1	-	[a:h+b+c]
Me8-Em9.730	0	0	10	0	66	11	5,68	1	**	[a+h+d:b]
Me8-Em9.900	0	0	14	0	44	29	0,02	1	-	[a+h+d:b]
Me9-Em6.180	0	0	0	79	0	8	26,33	1	*****	[a:h+b+c]
Me9-Em6.310	13	0	0	60	0	14	2,01	1	-	[a:h+b+c]
Me9-Em6.650	0	0	51	0	28	8	65,93	1	*****	[a+h+d:b]
Me9-Em6.655	0	0	71	0	9	7	173,40	1	*****	[a+h+d:b]
Me9-em7.380	11	0	0	62	0	14	3,84	1	*	[a:h+b+c]
Me9-em7.620	0	0	8	0	65	14	7,68	1	***	[a+h+d:b]
Me9-em7.655	16	0	0	52	0	19	0,08	1	-	[a:h+b+c]
Me9-Em8.460	16	0	0	61	0	10	0,73	1	-	[a:h+b+c]
Me9-Em8.490	11	0	0	71	0	5	5,87	1	**	[a:h+b+c]
SNP_1027_510862	7	0	43	0	0	37	101,84	2	*****	[a:h:b]
SNP_1027_510865	7	0	42	0	0	38	99,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_1027_510883	6	1	43	0	0	37	100,84	2	*****	[a:h:b]
SNP_1027_510895	7	0	42	0	0	38	99,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_1027_510966	6	0	43	0	0	38	104,88	2	*****	[a:h:b]
SNP_103_43934	15	10	21	0	0	41	16,26	2	*****	[a:h:b]
SNP_1054_599609	10	3	28	0	0	46	45,68	2	*****	[a:h:b]
SNP_1054_599713	10	3	27	0	0	47	43,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_1054_599734	10	3	27	0	0	47	43,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505484	16	8	18	0	0	45	16,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505510	16	8	18	0	0	45	16,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505515	16	8	18	0	0	45	16,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505555	15	9	18	0	0	45	14,14	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505558	14	9	19	0	0	45	14,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505591	16	8	18	0	0	45	16,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505612	16	8	17	0	0	46	15,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_106_505620	16	8	18	0	0	45	16,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_1075_194026	14	4	22	0	0	47	28,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_1105_598798	6	1	45	0	0	35	106,58	2	*****	[a:h:b]
SNP_1118_423616	20	5	15	0	0	47	23,75	2	*****	[a:h:b]
SNP_1118_423673	20	5	16	0	0	46	24,22	2	*****	[a:h:b]
SNP_1118_423676	20	5	16	0	0	46	24,22	2	*****	[a:h:b]
SNP_1118_423732	19	6	16	0	0	46	20,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_1118_423739	20	5	16	0	0	46	24,22	2	*****	[a:h:b]
SNP_1120_677196	23	10	20	0	0	34	20,89	2	*****	[a:h:b]
SNP_1120_751722	30	6	12	0	0	39	40,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_1120_752230	24	5	11	0	0	47	30,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_115_43442	18	3	19	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_115_43772	17	4	19	0	0	47	25,80	2	*****	[a:h:b]

SNP_1193_573276	16	3	22	0	0	46	31,63	2	*****	[a:h:b]
SNP_1193_573300	12	3	26	0	0	46	39,44	2	*****	[a:h:b]
SNP_1291_254037	15	7	18	0	0	47	17,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_1291_254120	16	5	19	0	0	47	22,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_1291_254121	16	5	19	0	0	47	22,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_1315_458217	17	6	17	0	0	47	19,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_1315_458253	20	9	26	0	0	32	26,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_1319_686926	12	11	22	0	0	42	16,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_1319_686959	12	11	22	0	0	42	16,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_1319_686962	12	11	22	0	0	42	16,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_1339_458544	17	3	20	0	0	47	29,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_1364_174517	3	0	37	0	0	47	97,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_14_2113488	27	4	17	0	0	39	37,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_14_2113490	26	4	18	0	0	39	36,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_14_2113503	26	4	18	0	0	39	36,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_14_2113526	26	4	18	0	0	39	36,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_140_1262948	4	1	50	0	0	32	128,02	2	*****	[a:h:b]
SNP_140_1263031	6	0	44	0	0	37	107,76	2	*****	[a:h:b]
SNP_1401_256203	2	2	41	0	0	42	104,96	2	*****	[a:h:b]
SNP_1401_256267	2	2	38	0	0	45	96,10	2	*****	[a:h:b]
SNP_1401_256290	3	2	35	0	0	47	83,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_1401_256304	2	2	41	0	0	42	104,96	2	*****	[a:h:b]
SNP_1405_507779	22	12	21	0	0	32	17,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_1406_639194	16	7	34	0	0	30	43,81	2	*****	[a:h:b]
SNP_1445_38230	20	4	17	0	0	46	27,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_1445_38315	19	4	18	0	0	46	26,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_1446_636969	2	1	37	0	0	47	97,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_1446_637016	2	1	37	0	0	47	97,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_145_908006	7	0	37	0	0	43	84,91	2	*****	[a:h:b]
SNP_1479_619967	16	6	20	0	0	45	22,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_1479_619979	17	6	19	0	0	45	21,62	2	*****	[a:h:b]
SNP_1479_619989	16	6	18	0	0	47	19,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_151_323708	1	1	47	0	0	38	131,45	2	*****	[a:h:b]
SNP_1565_569468	18	3	21	0	0	45	31,29	2	*****	[a:h:b]
SNP_1566_36495	3	0	39	0	0	45	103,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_1566_36498	3	0	39	0	0	45	103,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_1566_36504	3	0	39	0	0	45	103,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_157_338731	1	1	42	0	0	43	116,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_1605_7679	21	6	14	0	0	46	22,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_170_1278782	15	3	24	0	0	45	34,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_1713_433656	3	1	39	0	0	44	99,37	2	*****	[a:h:b]

SNP_1713_433702	17	6	20	0	0	44	22,77	2	*****	[a:h:b]
SNP_1803_52672	20	2	19	0	0	46	33,44	2	*****	[a:h:b]
SNP_1810_222423	24	3	19	0	0	41	35,87	2	*****	[a:h:b]
SNP_1821_490280	16	9	18	0	0	44	14,72	2	*****	[a:h:b]
SNP_1828_527757	2	0	43	0	0	42	119,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_1828_527761	15	10	20	0	0	42	15,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_1865_37467	15	1	26	0	0	45	43,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_1865_37499	18	1	21	0	0	47	36,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_1865_37501	19	4	19	0	0	45	27,52	2	*****	[a:h:b]
SNP_1887_82906	17	6	19	0	0	45	21,62	2	*****	[a:h:b]
SNP_195_1119223	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_195_1119378	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_1968_545184	27	3	11	0	0	46	42,37	2	*****	[a:h:b]
SNP_1968_545245	23	5	13	0	0	46	28,32	2	*****	[a:h:b]
SNP_1968_545251	24	4	13	0	0	46	32,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_2026_250254	21	6	20	0	0	40	26,11	2	*****	[a:h:b]
SNP_2026_250348	20	6	21	0	0	40	26,11	2	*****	[a:h:b]
SNP_2026_250370	20	6	19	0	0	42	24,24	2	*****	[a:h:b]
SNP_2037_45872	23	5	26	0	0	33	36,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_2037_45879	23	5	26	0	0	33	36,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_2050_182967	20	4	16	0	0	47	26,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_2071_220313	16	7	20	0	0	44	20,30	2	*****	[a:h:b]
SNP_2071_220358	16	6	20	0	0	45	22,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_2107_195238	23	3	17	0	0	44	33,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_2134_13921	1	1	38	0	0	47	104,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_2176_450822	11	6	25	0	0	45	30,76	2	*****	[a:h:b]
SNP_2180_14529	12	8	20	0	0	47	17,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_2180_14724	13	7	20	0	0	47	19,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_2213_423945	23	15	21	0	0	28	14,39	2	*****	[a:h:b]
SNP_2213_423963	23	15	21	0	0	28	14,39	2	*****	[a:h:b]
SNP_2213_423978	21	15	21	0	0	30	12,79	2	****	[a:h:b]
SNP_2213_424131	23	15	21	0	0	28	14,39	2	*****	[a:h:b]
SNP_2232_352573	18	8	18	0	0	43	17,82	2	*****	[a:h:b]
SNP_2232_352732	13	9	23	0	0	42	20,64	2	*****	[a:h:b]
SNP_2246_125817	23	1	28	0	0	35	49,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_2246_125821	23	1	28	0	0	35	49,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_2246_125830	21	1	30	0	0	35	51,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_2246_125885	20	2	30	0	0	35	48,15	2	*****	[a:h:b]
SNP_2252_490081	13	3	24	0	0	47	34,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_2252_490129	13	3	24	0	0	47	34,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_2252_490227	12	3	25	0	0	47	37,35	2	*****	[a:h:b]

SNP_2252_490230	13	3	24	0	0	47	34,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_227_1015634	3	1	44	0	0	39	114,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_2282_95253	18	1	21	0	0	47	36,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_2306_233176	19	5	19	0	0	44	25,33	2	*****	[a:h:b]
SNP_2306_233379	18	5	21	0	0	43	26,68	2	*****	[a:h:b]
SNP_2306_233392	20	5	20	0	0	42	27,22	2	*****	[a:h:b]
SNP_2306_233420	19	5	21	0	0	42	27,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_2306_233438	19	5	21	0	0	42	27,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_231_1290740	7	0	41	0	0	39	96,17	2	*****	[a:h:b]
SNP_2324_465609	1	1	50	0	0	35	140,42	2	*****	[a:h:b]
SNP_2324_465736	2	1	54	0	0	30	147,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_2383_372807	1	1	46	0	0	39	128,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_2383_373093	1	1	46	0	0	39	128,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_2388_293510	3	1	36	0	0	47	90,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_2388_293755	3	2	35	0	0	47	83,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_248_19443	19	5	17	0	0	46	23,63	2	*****	[a:h:b]
SNP_2524_242720	19	11	22	0	0	35	17,65	2	*****	[a:h:b]
SNP_2524_242770	18	10	23	0	0	36	19,82	2	*****	[a:h:b]
SNP_2524_242995	19	10	23	0	0	35	20,31	2	*****	[a:h:b]
SNP_2569_430007	20	9	14	0	0	44	16,21	2	*****	[a:h:b]
SNP_2575_76503	12	5	32	0	0	38	47,37	2	*****	[a:h:b]
SNP_259_9441	10	2	28	0	0	47	48,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_2642_352447	16	3	26	0	0	42	38,24	2	*****	[a:h:b]
SNP_2688_360575	10	3	34	0	0	40	60,28	2	*****	[a:h:b]
SNP_2688_360588	20	5	22	0	0	40	29,30	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397576	15	6	19	0	0	47	20,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397607	14	6	20	0	0	47	21,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397616	15	6	20	0	0	46	21,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397728	14	6	20	0	0	47	21,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397757	15	6	20	0	0	46	21,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_2689_397764	15	6	20	0	0	46	21,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_2710_234397	0	2	42	0	0	43	116,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_2710_234445	20	10	14	0	0	43	14,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_2831_286265	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_2831_286369	21	6	18	0	0	42	24,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_2831_286398	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_2831_286401	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_2831_286406	23	6	18	0	0	40	27,13	2	*****	[a:h:b]
SNP_2840_284468	15	5	23	0	0	44	28,30	2	*****	[a:h:b]
SNP_2840_284647	15	5	24	0	0	43	29,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_291_212683	5	2	33	0	0	47	71,60	2	*****	[a:h:b]

SNP_2940_38211	13	6	22	0	0	46	24,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_2940_38217	13	5	23	0	0	46	28,32	2	*****	[a:h:b]
SNP_2940_38264	14	5	21	0	0	47	24,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_2940_38330	14	5	22	0	0	46	26,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_2976_289040	22	8	18	0	0	39	22,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_2976_289057	22	8	18	0	0	39	22,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_2976_289355	23	7	16	0	0	41	24,39	2	*****	[a:h:b]
SNP_2976_289395	23	7	18	0	0	39	25,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_2976_289404	23	7	18	0	0	39	25,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_3011_218509	22	9	15	0	0	41	19,17	2	*****	[a:h:b]
SNP_3015_395310	35	2	5	0	0	45	77,24	2	*****	[a:h:b]
SNP_3015_395368	34	3	5	0	0	45	70,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_303_869881	15	10	18	0	0	44	12,72	2	****	[a:h:b]
SNP_3037_337280	19	4	17	0	0	47	25,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_315_1125221	20	8	13	0	0	46	17,63	2	*****	[a:h:b]
SNP_3176_244368	3	1	45	0	0	38	117,08	2	*****	[a:h:b]
SNP_3176_244468	3	1	45	0	0	38	117,08	2	*****	[a:h:b]
SNP_3176_244502	2	1	45	0	0	39	121,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_3183_290319	5	1	35	0	0	46	81,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_3183_290616	5	1	35	0	0	46	81,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_3191_245049	33	1	6	0	0	47	72,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_3191_245073	37	2	6	0	0	42	80,07	2	*****	[a:h:b]
SNP_3191_245144	36	2	6	0	0	43	77,27	2	*****	[a:h:b]
SNP_3210_135027	27	2	24	0	0	34	45,64	2	*****	[a:h:b]
SNP_3210_71480	23	3	14	0	0	47	32,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_3225_208354	15	9	18	0	0	45	14,14	2	*****	[a:h:b]
SNP_3225_208394	12	9	19	0	0	47	14,55	2	*****	[a:h:b]
SNP_3225_208412	14	9	19	0	0	45	14,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_3225_208673	13	9	19	0	0	46	14,66	2	*****	[a:h:b]
SNP_3293_208683	28	3	12	0	0	44	43,74	2	*****	[a:h:b]
SNP_3293_208702	28	3	12	0	0	44	43,74	2	*****	[a:h:b]
SNP_3293_208895	28	3	12	0	0	44	43,74	2	*****	[a:h:b]
SNP_3294_137295	20	6	17	0	0	44	22,77	2	*****	[a:h:b]
SNP_3294_137456	20	6	15	0	0	46	21,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_3294_137473	20	6	17	0	0	44	22,77	2	*****	[a:h:b]
SNP_3294_53494	18	7	15	0	0	47	17,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_332_777846	13	7	26	0	0	41	29,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_332_777895	13	7	26	0	0	41	29,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_332_778002	13	7	26	0	0	41	29,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_332_778060	13	7	26	0	0	41	29,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_3372_87553	21	10	18	0	0	38	17,53	2	*****	[a:h:b]

SNP_3372_87646	22	9	18	0	0	38	20,27	2	*****	[a:h:b]
SNP_34_110493	10	7	28	0	0	42	35,76	2	*****	[a:h:b]
SNP_34_110799	10	8	27	0	0	42	31,53	2	*****	[a:h:b]
SNP_3444_167891	20	5	19	0	0	43	26,32	2	*****	[a:h:b]
SNP_3466_253281	12	3	29	0	0	43	45,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_3568_154080	26	11	10	0	0	40	24,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_3568_154124	26	11	10	0	0	40	24,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_3568_154140	26	11	10	0	0	40	24,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_3568_154233	26	11	10	0	0	40	24,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_3568_154239	26	11	9	0	0	41	25,09	2	*****	[a:h:b]
SNP_359_444475	20	4	17	0	0	46	27,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_359_444491	20	4	17	0	0	46	27,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_3627_243227	19	3	24	0	0	41	35,87	2	*****	[a:h:b]
SNP_3645_199895	18	7	17	0	0	45	18,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_365_1119261	1	2	42	0	0	42	112,07	2	*****	[a:h:b]
SNP_365_1119266	22	5	17	0	0	43	27,41	2	*****	[a:h:b]
SNP_365_1119436	1	2	42	0	0	42	112,07	2	*****	[a:h:b]
SNP_365_1119505	21	5	18	0	0	43	26,68	2	*****	[a:h:b]
SNP_365_1119524	23	5	17	0	0	42	28,82	2	*****	[a:h:b]
SNP_3671_341247	22	5	25	0	0	35	34,27	2	*****	[a:h:b]
SNP_3671_341262	23	4	23	0	0	37	35,28	2	*****	[a:h:b]
SNP_373_720302	4	0	41	0	0	42	105,84	2	*****	[a:h:b]
SNP_373_720335	3	0	41	0	0	43	109,64	2	*****	[a:h:b]
SNP_373_720606	23	3	17	0	0	44	33,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_3731_321919	14	9	24	0	0	40	22,15	2	*****	[a:h:b]
SNP_3781_81098	16	7	20	0	0	44	20,30	2	*****	[a:h:b]
SNP_3781_81103	17	7	20	0	0	43	20,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_3855_125785	23	12	20	0	0	32	17,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_3855_251067	21	5	19	0	0	42	27,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_3855_251096	18	6	19	0	0	44	22,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8282	25	3	12	0	0	47	37,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8288	25	3	12	0	0	47	37,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8296	25	3	13	0	0	46	36,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8327	25	3	12	0	0	47	37,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8346	25	3	13	0	0	46	36,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8511	25	3	13	0	0	46	36,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_3911_8558	25	3	13	0	0	46	36,90	2	*****	[a:h:b]
SNP_3983_39327	0	2	46	0	0	39	128,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_4032_255307	18	4	19	0	0	46	26,61	2	*****	[a:h:b]
SNP_4032_255408	17	6	19	0	0	45	21,62	2	*****	[a:h:b]
SNP_4032_255471	17	6	17	0	0	47	19,60	2	*****	[a:h:b]

SNP_4032_255806	17	7	18	0	0	45	18,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_415_1071805	17	5	21	0	0	44	26,07	2	*****	[a:h:b]
SNP_415_585805	14	3	23	0	0	47	32,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_418_35397	23	5	16	0	0	43	28,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_418_35420	23	5	15	0	0	44	28,30	2	*****	[a:h:b]
SNP_420_991583	20	7	17	0	0	43	20,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_420_991586	19	5	17	0	0	46	23,63	2	*****	[a:h:b]
SNP_420_991664	19	7	15	0	0	46	18,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_425_1054684	13	4	23	0	0	47	30,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_4342_251802	31	2	7	0	0	47	61,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_4342_252048	31	2	8	0	0	46	59,20	2	*****	[a:h:b]
SNP_436_704282	27	3	12	0	0	45	41,57	2	*****	[a:h:b]
SNP_4382_153795	23	4	14	0	0	46	30,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_4382_153801	23	4	14	0	0	46	30,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_4382_153804	23	4	14	0	0	46	30,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_4382_153810	23	4	14	0	0	46	30,51	2	*****	[a:h:b]
SNP_4407_37081	2	0	48	0	0	37	134,64	2	*****	[a:h:b]
SNP_4407_37120	2	0	48	0	0	37	134,64	2	*****	[a:h:b]
SNP_4480_230025	23	5	16	0	0	43	28,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_4510_163996	27	7	12	0	0	41	32,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_4510_164005	27	7	12	0	0	41	32,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_4510_164007	26	7	12	0	0	42	30,07	2	*****	[a:h:b]
SNP_4533_9468	1	3	44	0	0	39	113,79	2	*****	[a:h:b]
SNP_4587_63080	19	8	18	0	0	42	18,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_4587_63093	19	8	18	0	0	42	18,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_4619_162202	21	5	16	0	0	45	25,57	2	*****	[a:h:b]
SNP_4674_11261	3	1	50	0	0	33	131,89	2	*****	[a:h:b]
SNP_4674_11263	5	1	45	0	0	36	109,82	2	*****	[a:h:b]
SNP_47_1269990	1	1	40	0	0	45	110,52	2	*****	[a:h:b]
SNP_47_1270046	1	1	40	0	0	45	110,52	2	*****	[a:h:b]
SNP_47_1270074	1	1	40	0	0	45	110,52	2	*****	[a:h:b]
SNP_4722_208292	18	5	18	0	0	46	23,44	2	*****	[a:h:b]
SNP_4722_208605	18	7	18	0	0	44	19,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_4818_29685	14	2	29	0	0	42	47,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_4818_29693	14	2	27	0	0	44	43,23	2	*****	[a:h:b]
SNP_4879_70897	22	1	18	0	0	46	37,88	2	*****	[a:h:b]
SNP_4937_188689	15	9	16	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_4937_188703	15	9	16	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_4937_188741	16	9	15	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_4937_189050	15	9	16	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_5044_165803	4	1	39	0	0	43	95,77	2	*****	[a:h:b]

SNP_5196_173330	2	1	37	0	0	47	97,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_5267_58282	14	7	19	0	0	47	18,15	2	*****	[a:h:b]
SNP_5267_58385	14	7	19	0	0	47	18,15	2	*****	[a:h:b]
SNP_528_185522	2	0	38	0	0	47	104,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_528_185571	2	0	38	0	0	47	104,80	2	*****	[a:h:b]
SNP_531_972944	18	8	19	0	0	42	18,73	2	*****	[a:h:b]
SNP_5380_60047	19	5	20	0	0	43	26,32	2	*****	[a:h:b]
SNP_5380_60067	17	6	19	0	0	45	21,62	2	*****	[a:h:b]
SNP_5380_60111	2	1	41	0	0	43	109,23	2	*****	[a:h:b]
SNP_5380_60122	16	4	22	0	0	45	29,24	2	*****	[a:h:b]
SNP_5424_190839	35	1	10	0	0	41	69,26	2	*****	[a:h:b]
SNP_5442_81747	37	5	10	0	0	35	61,96	2	*****	[a:h:b]
SNP_5442_81858	31	7	15	0	0	34	38,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_558_642868	22	8	18	0	0	39	22,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_5710_157403	25	1	21	0	0	40	43,77	2	*****	[a:h:b]
SNP_5723_103698	14	6	22	0	0	45	24,48	2	*****	[a:h:b]
SNP_5802_96479	15	9	16	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_597_628671	14	5	22	0	0	46	26,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_597_628673	14	5	22	0	0	46	26,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_603_144655	15	9	16	0	0	47	12,15	2	****	[a:h:b]
SNP_6111_80184	15	4	21	0	0	47	27,40	2	*****	[a:h:b]
SNP_6111_80202	15	5	20	0	0	47	23,75	2	*****	[a:h:b]
SNP_6111_80601	18	3	19	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_6418_15265	24	6	18	0	0	39	28,50	2	*****	[a:h:b]
SNP_6418_15292	23	7	18	0	0	39	25,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_6418_15321	23	7	18	0	0	39	25,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_6637_24292	21	11	22	0	0	33	19,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_6637_24391	22	13	19	0	0	33	14,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_6637_24406	21	11	22	0	0	33	19,00	2	*****	[a:h:b]
SNP_6790_22476	18	12	15	0	0	42	10,20	2	***	[a:h:b]
SNP_6790_22796	16	11	18	0	0	42	11,93	2	****	[a:h:b]
SNP_6837_40022	19	3	18	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_34342	1	1	40	0	0	45	110,52	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_34381	16	6	20	0	0	45	22,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_34418	16	6	20	0	0	45	22,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_34420	16	6	20	0	0	45	22,19	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_34457	12	5	25	0	0	45	32,43	2	*****	[a:h:b]
SNP_6980_38297	2	2	39	0	0	44	99,05	2	*****	[a:h:b]
SNP_6992_73103	10	1	32	0	0	44	61,60	2	*****	[a:h:b]
SNP_6992_73127	21	3	20	0	0	43	32,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_7026_18907	23	4	13	0	0	47	30,60	2	*****	[a:h:b]

SNP_708_460116	25	4	19	0	0	39	34,83	2	*****	[a:h:b]
SNP_720_816528	19	5	20	0	0	43	26,32	2	*****	[a:h:b]
SNP_733_135452	18	5	21	0	0	43	26,68	2	*****	[a:h:b]
SNP_733_152135	23	13	12	0	0	39	15,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_733_152136	30	11	7	0	0	39	36,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_733_152142	23	13	12	0	0	39	15,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_733_152148	23	13	12	0	0	39	15,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_772_526846	12	8	24	0	0	43	24,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_772_526891	12	8	24	0	0	43	24,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_772_526973	13	8	23	0	0	43	22,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_772_527006	13	8	23	0	0	43	22,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_772_527012	13	8	23	0	0	43	22,36	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43577	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43635	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43637	21	8	24	0	0	34	26,17	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43639	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43751	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43797	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43818	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7801_43854	22	7	24	0	0	34	28,85	2	*****	[a:h:b]
SNP_7822_36139	18	7	15	0	0	47	17,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_7822_36178	19	3	18	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_7822_36491	19	3	18	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_7822_36542	19	3	18	0	0	47	28,95	2	*****	[a:h:b]
SNP_8053_55636	22	3	26	0	0	36	40,33	2	*****	[a:h:b]
SNP_8053_55646	23	3	25	0	0	36	39,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_8053_55723	23	3	25	0	0	36	39,86	2	*****	[a:h:b]
SNP_8053_55874	24	3	24	0	0	36	39,71	2	*****	[a:h:b]
SNP_8181_42175	17	9	18	0	0	43	15,41	2	*****	[a:h:b]
SNP_8203_45727	35	5	8	0	0	39	60,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_85_1521477	20	8	23	0	0	36	24,37	2	*****	[a:h:b]
SNP_8507_40767	14	7	23	0	0	43	24,14	2	*****	[a:h:b]
SNP_8545_56224	11	6	26	0	0	44	32,81	2	*****	[a:h:b]
SNP_8545_56243	9	5	29	0	0	44	43,93	2	*****	[a:h:b]
SNP_8545_56254	12	6	25	0	0	44	30,21	2	*****	[a:h:b]
SNP_855_35497	14	5	31	0	0	37	43,56	2	*****	[a:h:b]
SNP_8720_52477	29	3	16	0	0	39	43,79	2	*****	[a:h:b]
SNP_9113_10944	10	8	25	0	0	44	27,42	2	*****	[a:h:b]
SNP_9246_15399	17	1	28	0	0	41	47,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_9246_15414	17	1	28	0	0	41	47,35	2	*****	[a:h:b]
SNP_9329_28626	15	13	19	0	0	40	10,06	2	***	[a:h:b]

SNP_949_215464	42	4	6	0	0	35	87,08	2	*****	[a:h:b]
SNP_949_215515	42	4	6	0	0	35	87,08	2	*****	[a:h:b]
SNP_949_215580	41	5	6	0	0	35	81,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_949_215596	41	5	6	0	0	35	81,04	2	*****	[a:h:b]
SNP_949_215612	42	4	6	0	0	35	87,08	2	*****	[a:h:b]
SNP_96_1173952	38	4	11	0	0	34	65,72	2	*****	[a:h:b]
SNP_9721_12872	10	7	31	0	0	39	42,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_9721_12880	10	7	31	0	0	39	42,46	2	*****	[a:h:b]
SNP_9721_12892	11	7	30	0	0	39	39,12	2	*****	[a:h:b]
SNP_9721_12899	11	6	31	0	0	39	43,67	2	*****	[a:h:b]
SNP_996_662787	5	0	37	0	0	45	90,76	2	*****	[a:h:b]

Tabla 31. Cofactores utilizados en la detección de QTLs por el método CIM (Composite Interval Mapping) en las distintas poblaciones: F_2 en el 2013, $F_{2:3}$ en el 2014 y en el 2015. Se indican con asteriscos los marcadores que presentaron segregación distorsionada ($0,01 \leq p \leq 0,001$). NV: número de vainas por planta, NS: número de semillas por planta, LV: longitud de la vaina (cm), PS: peso de semilla (g), AP: altura de planta (cm), SV: número de semillas por vaina, AV: ancho de la vaina (cm), DF: días a 50 % de floración de la parcela, DS: diámetro de semilla (cm).

NV F_2 (2013)	NV $F_{2:3}$ (2014)	NV $F_{2:3}$ (2015)
SNP_4722_208292 Me8-Em7.666 Me5-Em2.630* Me2-Em5.360	SNP_1828_527761* AC58 SNP_603_144655*	SNP_1828_527761* SNP_115_43442*
NS F_2 (2013)	NS $F_{2:3}$ (2015)	LV F_3 (2015)
Me8-Em7.666 Me3-Em2.750 SNP_996_662787 Me2-Em5.360	Me1-Em3.600* Me10-Em8.530	Me3-Em2.775* Me7-Em9.350 Me7-Em9.450
PS F_2 (2013)	PS $F_{2:3}$ (2014)	PS $F_{2:3}$ (2015)
Me7-Em9.545 AA278	Me8-Em8.505 Me2-Em4.697	Me4-Em5.680* AA160
AP F_2 (2013)	AP $F_{2:3}$ (2014)	AP $F_{2:3}$ (2015)
Me8-Em7.674	Me5-Em5.595	SNP_603_144655*
SV F_2 (2013)	Me6-Em7.570	AA278
D21	AA278	SV $F_{2:3}$ (2014)
Me1-Em3.280*		Me7-Em8.340
AV F_2 (2013)	AV $F_{2:3}$ (2014)	AV $F_{2:3}$ (2015)
Me4-Em4.570 Me5-Em2.750 Me5-Em2.745	Me4-Em4.570 Me10-Em7.270	Me1-Em3.600* Me5-Em5.205 Me10-Em8.175
DF F_2 (2013)	DF $F_{2:3}$ (2014)	DF $F_{2:3}$ (2015)
Me8-Em7.666 Me7-Em9.545 Me6-Em8.540	Me10-Em6.265 Me4-Em5.680 Me10-Em8.175	Me10-Em6.265 Me2-Em4.697 AA278
DS F_2 (2013)	DS $F_{2:3}$ (2014)	DS $F_{2:3}$ (2015)
Me7-Em8.240 AA160 Me2-Em2.762	Me6-Em6.680 Me1-Em5.255 Me5-Em2.755*	Me3-Em2.775* Me7-Em9.350 Me7-Em9.450

Figura 15. Gráficos de LOD en función de la posición genética (cM) para el análisis de QTLs relacionados a AP (altura de planta), DF (días a 50 % de floración de la parcela), LV (longitud de la vaina), AV (ancho de la vaina), NV (número de vainas por planta) NS (número de semillas por planta), PS (peso de semilla), SV (número de semillas por vaina) en la población F_2 .

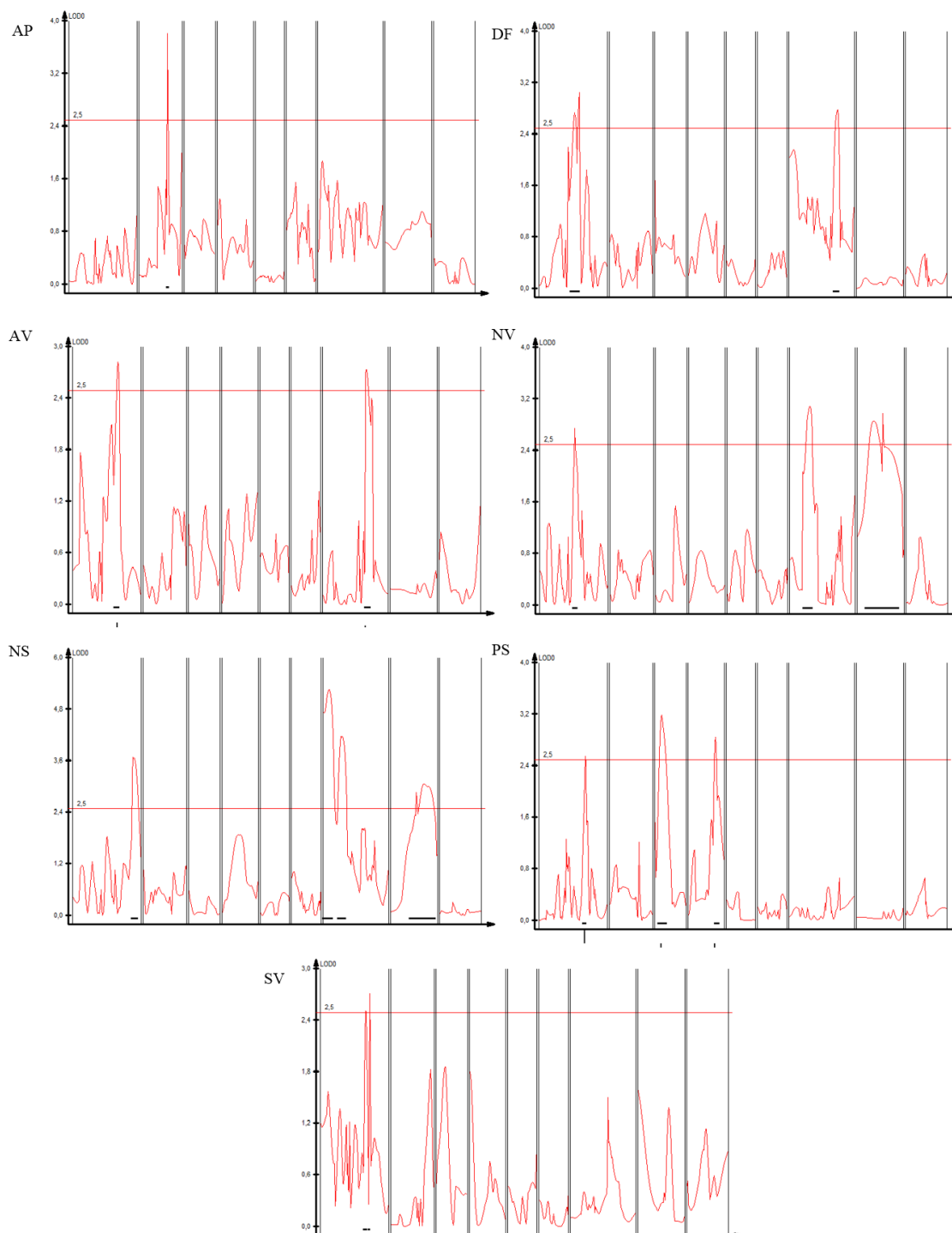


Figura 16. Gráficos de LOD en función de la posición genética (cM) para el análisis de QTLs relacionados a AP (altura de planta), DF (días a 50 % de floración de la parcela), AV (ancho de la vaina), NV (número de vainas por planta), DS (diámetro de semilla), PS (peso de semilla), SV (número de semillas por vaina) en la población $F_{2:3}$ evaluada en el año 2014.

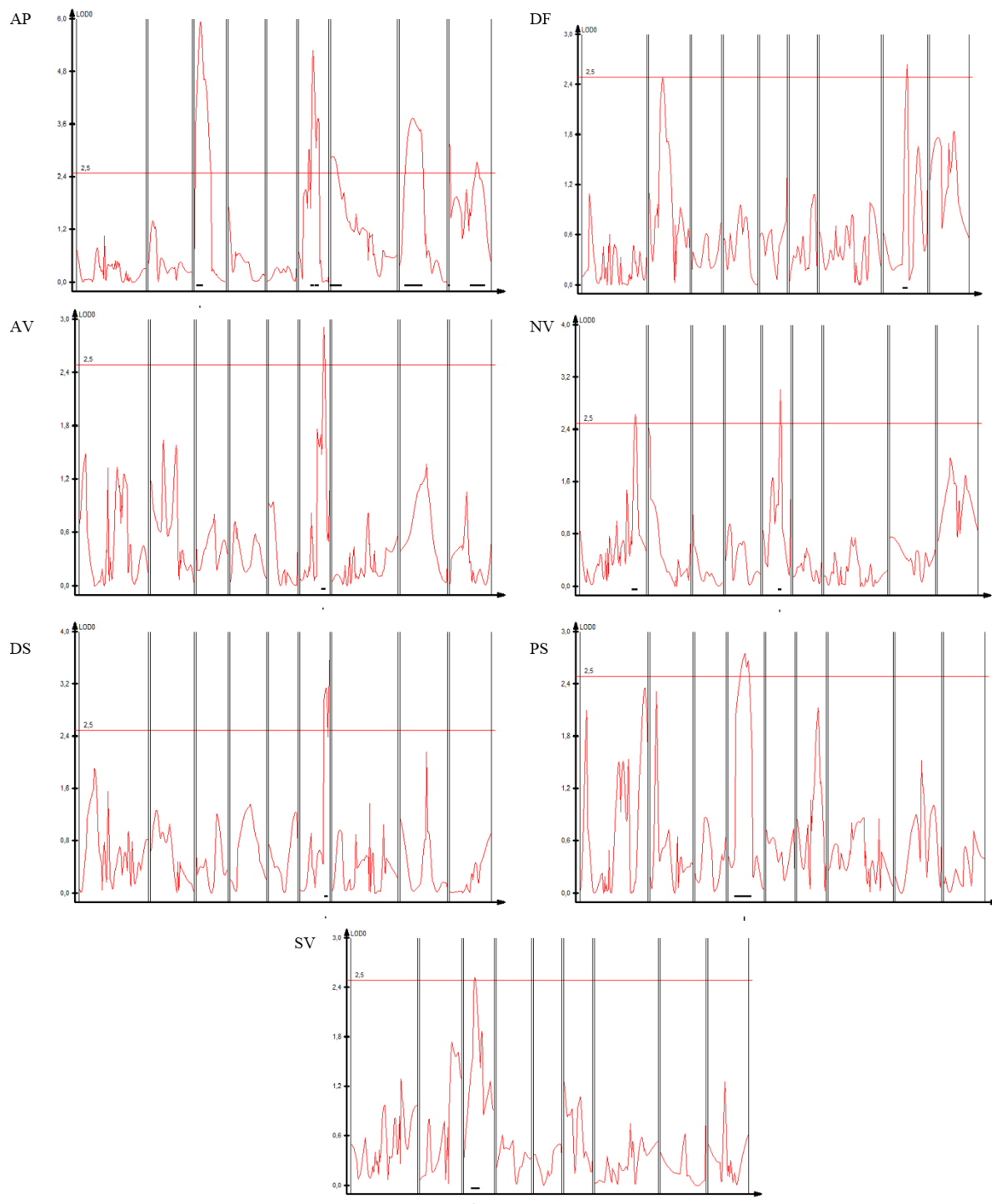


Figura 17. Gráficos de LOD en función de la posición genética (cM) para el análisis de QTLs relacionados a AP (altura de planta), DF (días a 50 % de floración de la parcela), AV (ancho de la vaina), LV (longitud de la vaina), DS (diámetro de semilla), PS (peso de semilla), NV (número de vainas por planta) NS (número de semillas por planta) en la población $F_{2:3}$ evaluada en el año 2015.

