



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

**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**

Lic. PAULA ALMIRÓN

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. ENRIQUE L. COINTRY

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

Paula Almirón

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 2010 y Diciembre de 2014, bajo la dirección del Dr. Enrique Cointry.

Nombre y firma del Doctorando: Paula Amirón

Nombre y firma del Director: Dr. Enrique Cointry

Defendida:de 20__.

DEDICATORIAS

A mis padres.

A Pablo y mis dos hijas.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Almirón, P. y Cointry, E.L.** “Caracterización agromorfológica de los recursos fitogenéticos de una colección activa del género *Pisum*”. *XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario, Argentina, 30/11/2015 y 01/12/2015. *Póster*.
- **Almirón, P., Cravero, V.P. y Cointry, E.L.** “Diversidad genética y relaciones genéticas entre accesiones del género *Pisum* revelada por SRAP y SSR”. *XLIII Congreso Argentino de Genética y IV Reunión Regional SAG - La Pampa Patagonia*. S. C. de Bariloche, Argentina, 22/10/2014 - 22/10/2014. *Póster*.
- **Almirón, P., Bermejo, C., Guindón, M.F., Cointry, E.L.** “Análisis de la diversidad genética en una colección de *Pisum sativum* L. mediante SSR”. *VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología. REDBIO 2013*. Mar del Plata, Argentina, 18/11/2013 - 22/11/2013. *Póster*.
- **Espósito, M.A., Almirón, P., Gatti, I., Cravero, V.P., López Anido, F.S. y Cointry, E.L.** (2012). A rapid method to increase F1 plants number in breeding pea programs (*Pisum sativum* L.). *Genetic and Molecular Research*, 11 (3): 2729-2732.
- **Espósito, M.A., Almirón, P.; Gatti, I., Cravero, V.P. y Cointry, E.L.** “Predicción de cruza heteróticas para rendimiento en *Pisum sativum* L.” *XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad de Genética de Chile, y II Reunión Regional SAG – Litoral*. Rosario, Argentina, 28/10/2012 - 31/10/2012. *Póster*.
- **Gatti, I., Espósito, M.A., Almirón, P., Cravero, V.P y Cointry, E.L.** (2011) Diversity of pea (*Pisum sativum*) accessions based on morphological data for sustainable field pea breeding in Argentina. *Genetic and Molecular Research*, 10 (4): 3403-3410.
- **Espósito, M.A., Almirón, P., Gatti, I., Cravero, V.P., López Anido, F. y Cointry, E.L.** “Un método rápido para incrementar el número de plantas F1 en programas de mejoramiento de arveja (*Pisum sativum* L.)” *XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario, Argentina, 1y2/12/2011. *Póster*.

- **Almirón, P. y Cointry, E.L.** “Estimación de la variabilidad presente en una colección de arveja (*Pisum sativum* L.) a fin de racionalizar su uso y conservación.” *XXXIV Congreso Argentino de Horticultura. ASAHO*. Buenos Aires, Argentina, 27/09/2011-30/09/2011. *Póster*.
- **Espósito, M.A., Almirón, P.; Gatti, I.; Cravero, V.P.y Cointry, E.L.** “Identificación de parentales e híbridos superiores de arveja (*Pisum sativum* L.) en un análisis línea x tester” *XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA*. Corrientes, Argentina, 18/09/2011 -.21/09/2011. *Póster*.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. ORIGEN Y TAXONOMÍA	9
2. MORFOLOGÍA.....	12
3. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE <i>P. sativum</i>	13
4. CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS	15
4.1. Recursos fitogenéticos	15
4.2. Clasificación de las Colecciones de germoplasma	17
5. COLECCIÓN NÚCLEO	19
5.1. Elaboración de una Colección Núcleo	20
6. <i>Pisum</i> : DIVERSIDAD GENÉTICA Y CONSERVACIÓN	22
7. MARCADORES GENÉTICOS.....	26
7.1. Marcadores morfológicos	26
7.1.1. Interacción Genotipo por Ambiente	27
7.2. Marcadores bioquímicos	27
7.3. Marcadores moleculares	28
7.3.1. Marcadores Microsatélites	29
7.3.2. Marcadores SRAP	30
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL	32
CAPÍTULO 1:.....	33
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS DE UNA COLECCIÓN ACTIVA DEL GÉNERO <i>Pisum</i>	33
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. OBTENCIÓN DEL GERMOPLASMA	35

2.2.	Caracterización morfológica, fenológica y PRODUCTIVA.....	35
2.2.1.	Ambientes de evaluación y diseño experimental	35
2.2.2.	Caracteres analizados.....	36
2.2.3.	Análisis estadísticos.....	37
2.2.3.1.	Variables cualitativas.....	37
2.2.3.2.	Evaluación de la variabilidad entre accesiones para los distintos caracteres cuantitativos en cada ambiente analizado (años 2011, 2012 y 2013)	38
2.2.3.3.	Evaluación y estimación del efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para variables cuantitativas	38
2.2.3.4.	Análisis de Componentes Principales.....	39
2.2.3.5.	Análisis de conglomerados.....	40
2.3.	Caracterización molecular	41
2.3.1.	Extracción de ADN genómico.....	41
2.3.2.	Marcadores tipo SSR	41
2.3.3.	Marcadores tipo SRAP	43
2.3.4.	Análisis estadísticos.....	44
2.3.4.1.	Medidas de variabilidad genética	44
2.3.4.2.	Correlación entre SSR y SRAP	45
2.3.4.3.	Análisis de Variancia Molecular.....	46
2.3.4.4.	Análisis de agrupamiento	46
2.4.	ANÁLISIS CONJUNTO DE LA INFORMACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR.....	47
2.4.1.	Análisis de Procrustes Generalizado.....	47
2.4.1.	Análisis de Conglomerados.....	48
3.	RESULTADOS.....	49
3.1.	Caracterización morfológica, fenológica y PRODUCTIVA	49
3.1.1.	Caracteres cualitativos	49
3.1.2.	Caracteres cuantitativos.....	55
3.1.2.1.	Evaluación de la variabilidad entre accesiones para los distintos caracteres en cada ambiente analizado	55
3.1.2.2.	Evaluación del efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para las variables cuantitativas.....	57
3.1.2.3.	Condiciones climáticas en los distintos años evaluados	61
3.1.2.4.	Análisis de Componentes Principales.....	62

3.1.3.	Análisis de conglomerados	66
3.2.	Caracterización molecular	72
3.2.1.	Medidas de Variabilidad Genética	72
3.2.1.1.	Marcadores tipo SSR	72
3.2.1.2.	Marcadores tipo SRAP	73
3.2.2.	Correlación entre SSR y SRAP	75
3.2.3.	Análisis de Variancia Molecular (AMOVA).....	76
3.2.4.	Análisis de agrupamiento	77
3.3.	ANÁLISIS CONJUNTO DE LA INFORMACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR.....	81
3.3.1.	Análisis de Procrustes Generalizado.....	81
3.3.2.	Análisis de Conglomerados.....	84
CAPÍTULO 2:.....		86
ESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN NÚCLEO		86
1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	88
2.1.	Formación de la colección núcleo	88
2.1.1.	Estratificación.....	88
2.1.2.	Determinación del número de accesiones a incluir en la colección núcleo	89
2.1.3.	Selección de accesiones.....	90
2.2.	Validación de la Colección Núcleo	90
2.2.1.	Evaluación de las colecciones núcleo a nivel morfológico	90
2.2.2.	Evaluación de las colecciones núcleo a nivel molecular	92
2.2.3.	Evaluación de las colecciones núcleo definitiva a nivel fenotípico y molecular .	93
3.	RESULTADOS.....	94
3.1.	Formación de la colección núcleo	94
3.1.1.	Estratificación.....	94
3.1.1.1.	Aplicación del criterio E1	94
3.1.1.2.	Aplicación del criterio E2	94
3.1.2.	Determinación del número de accesiones a conformar la colección núcleo	98
3.1.3.	Selección de accesiones.....	101
3.1.4.	Estrategia M.....	104

3.2. Validación de la Colección Núcleo	105
3.2.1. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel morfológico	105
3.2.2. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel molecular	109
3.2.3. Evaluación de las colecciones núcleo definitiva a nivel fenotípico y molecular	112
DISCUSIÓN.....	114
CONCLUSIONES GENERALES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	133
ANEXO	152

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A: número de alelos.

ACoorP: Análisis de Coordenadas Principales.

ACP: Análisis de Componentes Principales.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

A_e: Número efectivo de alelos.

af: Gen cuya expresión modifica la forma y el tamaño de folíolos y/o estípulas en arveja.

AFLP: *Amplified Fragment Length Polimorphism.*

AH: Ancho de hoja.

AE: Ancho de la estípula.

AMOVA: Análisis de la Variancia Molecular.

ANOVA: Análisis de la Variancia.

AP: Altura de la planta.

APG: Análisis de Procrustes Generalizado.

ARS: *Agricultural Research Service.*

AV: Ancho de vaina.

BH: Borde de la hoja.

CA: Colección activa.

CC: Colección núcleo.

CCs: Colecciones núcleo.

CF: Color de flor.

CG1: Coloración de granos seco 1.

CG2: Coloración de grano seco 2.

cm: Centímetro.

CM: Cuadrado medio.

Cod: Código de las accesiones.

Comp. Var.: Componente de Variación.

CP: Componentes Principales.

CR%: Porcentaje de coincidencia de rango.

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

curV: Curvatura de la vaina.

CV: Color de la vaina.

CV%: Coeficiente de variación.

CzNPC: *Czech National Pea Collection*.

DC: Días a fin de cosecha.

DCA: Diseño completamente aleatorizado.

DF: Días a 50% de floración.

DG: Diámetro de grano.

disV: Forma de la parte distal de la vaina.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

DV: Días a primera vaina.

E.E.: Error estándar.

E: Tipo de estípula.

E1F: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 1 y la estrategia fija.

E1L: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 1 y la estrategia logarítmica.

E1P: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 1 y la estrategia proporcional.

E2F: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 2 y la estrategia fija.

E2L: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 2 y la estrategia logarítmica.

E2P: Colección núcleo obtenida con la metodología de estratificación 2 y la estrategia proporcional.

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético.

EMBRAPA: *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (Empresa Brasileira de investigación Agropecuária).

EST: *Expressed Sequence Tags*.

etc: Etcétera.

F: Estrategia fija.

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización para la Alimentación y la Agricultura).

g: Gramo.

G: Grupo.

GL: Grados de libertad.

GLM: Modelo lineal generalizado.

GxA: *Interacción genotipo por ambiente.*

H: Diversidad Genética.

ha: hectárea.

IBPGR: *International Plant Genetic Resources Institute* (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos).

ICARDA: *Internacional Center for Agricultural Research in the Dry Areas.*

INRA: *Institut National de la Recherche Agronomique* (Instituto Nacional para la Investigación Agronómica).

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

ISSR: *Inter Simple Sequence Repeats.*

JIC: *John Innes Centre.*

L: Estrategia logarítmica.

LE: Longitud de la estípula.

LH: Longitud de la hoja.

LV: Longitud de la vaina.

m: Metro.

MD%: Diferencia relativa porcentual de valores medios.

MD: Diferencias de valores medios.

mg: Miligramos.

min: Minutos.

mm: Milímetro.

mM: Milimolar.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

ng/ml: Nanogramo por mililitro.

ng: Nanogramos.

NG: Número de granos por parcela.

NPF: Número de pares de folíolos en el primer nudo floral.

NPV: Nudo de la primera vaina.

Nro: Número.

NS: Diferencias no significativas.

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

P: Estrategia proporcional.

p: Valor p (Estadístico de probabilidad).

PAM: Plan de Acción Mundial.

pb: Pares de bases.

PC: *Power Core*.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa).

PG: Peso de granos seco por parcela.

pg: Picogramo.

PIC: Contenido de información polimórfica.

PNF: Primer nudo floral.

PROMOSTA: Proyecto de Modernización de los Servicios de Tecnología Agrícola.

PVC: Policloruro de vinilo.

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*.

RBIP: *Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*.

RFAA: Recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación.

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

s: Segundo.

SC: Suma de cuadrado.

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato de dodecil de sodio).

SG: Subgrupo.

sp: Especie.

SP: Superficie de granos seco.

SRAP: *Sequence Related Amplified Polymorphism*

SSAP: *Sequence-Specific Amplification Polymorphism*.

ssp: Subespecie.

SSR: *Simple Sequence Repeat Polymorphism* o microsatélite.

st: Gen cuya expresión modifica la forma y el tamaño de folíolos y/o estípulas en arveja.

SW: Índice de diversidad de Shannon-Weaver.

T: Temperatura.

TD: *Touchdown*.

tl: Gen cuya expresión modifica la forma y el tamaño de folíolos y/o estípulas en arveja.

U: Unidad.

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*.

UPOV: Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

USDA: *United States Department of Agriculture.*

var: Variedad botánica.

VD%: Diferencia relativa porcentual de varianzas.

VD: Diferencias de varianzas.

VP: Número de vainas por parcela.

VR%: Porcentaje de coeficiente de variación.

W: Watt.

%: Por ciento.

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

%P: Nivel de polimorfismo.

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

°C: Grados Centígrados.

μ: Media general.

μL: Microlitro.

μM: Micromolar.

φ_{PT}: Coeficiente de correlación

2n: Célula diploide.

RESUMEN

La conservación de los recursos fitogenéticos, articulada con una adecuada caracterización y evaluación, son tareas de interés mundial. Es esencial desarrollar mecanismos que permitan utilizar activamente los recursos fitogenéticos como fuente de diversidad genética útil para la obtención y mejora de variedades. En la presente tesis se planteó como objetivo general estimar la diversidad genética disponible en una colección activa del género *Pisum* para conformar una colección núcleo validada. Se realizaron colectas de germoplasma en forma de semillas, alcanzando una colección activa de 126 accesiones del género *Pisum*. En cada una de las campañas a campo se evaluaron un total de 26 descriptores morfológicos, fenológicos y agronómicos. Para todos estos caracteres se encontró una alta variabilidad fenotípica y genotípica. La evaluación de los efectos ambiente e interacción genotipo por ambiente, mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) o altamente significativas ($p < 0,001$), para muchas de las variables cuantitativas. A fin de despejar los efectos genotípicos, se calcularon los valores promedios ajustados para cada descriptor cuantitativo. En el análisis de agrupamiento considerando los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos, las accesiones de *P. abyssinicum* mostraron ser más similares a las formas silvestres de *P. fulvum* que a las accesiones de *P. sativum*. El género *Pisum* contiene dos o tres especies dependiendo de la interpretación taxonómica. Actualmente, las clasificaciones taxonómicas existentes en la literatura son confusas.

La caracterización molecular se realizó por medio de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) y SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*). Las medidas de variabilidad genética estimadas fueron elevadas. Para SSR el número de alelos promedio fue de 8,4, la Diversidad Genética fue 0,842 y el PIC promedio fue 0,824. Para SRAP el nivel de polimorfismo fue de 96,52% y el valor de PIC promedio fue 0,347. La correlación entre los marcadores SSR y SRAP fue analizada a nivel de las distancias genéticas individuales y de las distancias grupales (considerando 8 grupos taxonómicos). La correlación entre las distancias grupales fue alta y significativa ($r=0,78$, $p < 0,001$); mientras que la correlación individuo-individuo fue muy baja ($r=0,26$, $p < 0,001$). De este modo, la información obtenida a partir de marcadores moleculares SRAP, complementó a aquella obtenida a partir de los microsatélites. Los AMOVA (Análisis de Variancia Molecular) tanto para SSR como SRAP, sugirieron que existe variabilidad genética o que al menos uno de los 8 grupos taxonómicos considerados se diferencia de los

otros respecto a sus perfiles moleculares promedio ($p < 0,0001$). Además, dentro de los taxa de *Pisum* también se observó variabilidad genética ($p < 0,0001$). En los análisis del Análisis de Agrupamiento considerando los datos moleculares, las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum* se separaron marcadamente del resto de las accesiones de *P. sativum*. El análisis conjunto de los datos fenotípicos y moleculares se realizó por medio de un Análisis de Procrustes Generalizado (APG), el cual reveló un 77,6% de consenso entre los ordenamientos producidos por los marcadores SSR y SRAP, y los marcadores fenotípicos.

A partir de los análisis de la variabilidad existente en la colección activa de *Pisum*, se procedió a la construcción de una colección núcleo (CC) a fin de conservar la mayor parte de la variabilidad incluyendo un mínimo de accesiones. Se aplicaron diferentes metodologías que permitieron obtener distintas CCs, para luego elegir aquella CC que fuera más representativa de la colección original. En primer lugar, se analizaron dos criterios de estratificación, previo al análisis de agrupamiento. Para el primer criterio (E1), se consideraron todas las accesiones en conjunto (E1); y para el segundo (E2), se realizó una división primaria según la taxonomía. Posteriormente, para definir el número de accesiones de cada grupo que integrarían la CC se consideraron tres estrategias: Fija (F), Logarítmica (L) y Proporcional (P). Así, se generaron seis CCs; cuyo tamaño varió entre 16 y 34 accesiones. Además, se elaboró una séptima CC utilizando la estrategia M y el programa *PowerCore*; la cual presentó 58 accesiones. Este tamaño excedió al definido previamente para la CC (10-30% del tamaño de la colección activa). La validación de las CCs se realizó comparando la variabilidad presente en cada una de ellas con respecto a la colección activa, a través de diferentes parámetros obtenidos a partir de la caracterización morfológica y molecular. La estratificación inicial considerando la información taxonómica (E2), resultó más favorable que el criterio E1 en el proceso de elaboración de la CC. La Colección Núcleo conformada utilizando el criterio de estratificación E2 y la estrategia logarítmica, fue la que mejor representó la variabilidad inicial, conservando un 28% de las accesiones.

ABSTRACT**“ESTIMATE OF THE VARIABILITY PRESENT IN MATERIALS OF PEA (*P. sativum* L.) TO RATIONALIZE ITS USE AND CONSERVATION THROUGH THE ESTABLISHMENT OF A CORE COLLECTION”**

Conservation of plant genetic resources, articulated with a proper characterization and evaluation, are of worldwide interest. The aim of this thesis was to evaluate the genetic diversity available in an active collection of the genus *Pisum* in order to develop a validated core collection. 126 accessions belonging to the genus *Pisum* were characterized. Quantitative and qualitative morpho-vegetative characteristics were evaluated in three environments to determine the presence of variability between accessions. The environment and the genotype-environment interaction may modify the characteristic's expression and complicate their evaluation. These effects were eliminated by demonstrating that the observed variability has genetic origin. A molecular characterization was performed using SRAP and SSR markers. With both markers types variability parameters were estimated. The analysis of these parameters confirmed the presence of high variability. Using the morphological and molecular data, multivariate analysis techniques were applied and it was demonstrated that the information obtained from molecular markers complements the one obtained from morphological markers. The analysis of genetic relationships among accessions of *Pisum* was consistent with the existence of three species: *P. fulvum*, *P. sativum* and *P. abyssinicum*. A core collection was constructed with the purpose of preserve the highest variability with the less redundancy. Two stratification criteria previous to the grouping analysis were analyzed: the first one analyzing all the accessions together (E1) and the second one dividing by taxonomy (E2). Afterwards, to determine the number of accessions of each group that will be part of the core collection three strategies were considered (fixed; logarithmic and proportional). Also M strategy was applied, which not only defines the number of accessions that should form the core collection, but also identifies which accessions should be included. Once formed the eight possible core collections through the above strategies, we proceeded to validate them by comparing various parameters obtained from the morphological characterization and molecular characterization between the core collection and initial collection. These analyzes determined that the collection formed from strategy E2L would best represent the initial variability, retaining 28% of the accessions.

INTRODUCCIÓN

1. ORIGEN Y TAXONOMÍA

La arveja (*Pisum sativum* L.) es uno de los cultivos domesticados más antiguos del mundo (aproximadamente 10000 años atrás) (Ambrose, 1995; Zohary y Hopf, 2000). Si bien su zona de origen se encuentra en el Mediterráneo, principalmente en el Medio Oriente; a causa de haber sido domesticado muy tempranamente, es difícil identificar la localización precisa de su centro de origen y de diversidad. Además, hay que considerar que gran parte de la región Mediterránea y de Asia Central ha sido modificada por las actividades humanas y por el cambio climático.

Antes de ser cultivada, la arveja, junto con el garbanzo, 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. Luego, los cultivos de leguminosas de grano, trajeron estabilidad a las tribus que eran nómades, facilitando el establecimiento permanente de las aldeas. Posteriormente, por siglos de selección y mejora, miles de variedades de arveja fueron desarrolladas; las cuales, actualmente, se conservan en numerosas colecciones de germoplasma en todo el mundo (Smýkal *et al.*, 2011). Igualmente, muchos de los datos de pasaporte de las primeras colectas son incompletos, poco fiables o faltantes.

Debido también a la antigüedad del cultivo, no se conoce su posible antecesor. Makasheva (1979) propuso un antepasado común a los géneros *Pisum*, *Vavilovia*, *Vicia* y *Lathyrus*, que habría evolucionado a un antecesor extinto perenne de *Pisum* y, este último, en un antecesor anual de *Pisum*.

El género *Pisum* pertenece a la familia *Fabaceae*, el cual contiene dos o tres especies dependiendo de la interpretación taxonómica (Tabla 1). Junto a *Pisum sativum* L., otras dos especies suelen ser reconocidas: la especie silvestre *Pisum fulvum*, encontrada en Jordania, Siria, Líbano y Etiopía; y la especie *Pisum abyssinicum* de Yemen y Etiopía, la cual fue probablemente domesticada independientemente de *P. sativum* y está representada por formas silvestres y cultivadas (Jing *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2011; Ellis, 2011; Smýkal *et al.*, 2011; Upadhyaya *et al.*, 2011).

Tabla 1. Clasificación de las taxa del género *Pisum* según Smýkal *et al.* (2011) y NCBI *Taxonomy* (2015).

Espece (sp.)	Subespece (ssp.)	Variedad (var.)	Estatus
<i>P. sativum</i> L.	<i>sativum</i>	<i>sativum</i>	Cultivar
		<i>arvense</i> (L.) Poiret	
		<i>macrocarpon</i> Ser.	
		<i>choresmicum</i>	
		<i>ponderosum</i>	
		<i>tibeticum</i>	
	<i>elatius</i> (Bieb.) Aschers y Graebn.	<i>elatius</i>	Silvestre
		<i>brevipedunculatum</i> Davis y Meikle	
		<i>pumilio</i> (= <i>humile</i>) Meikle	
	<i>transcaucasicum</i> Gorovov		Cultivar / Silvestre
<i>jomardii</i> (Schrank) Kosterin		Silvestre	
<i>asiaticum</i> Gorovov		Cultivar / Silvestre	
<i>P. abyssinicum</i> A. Br		Silvestre / Cultivar	
<i>P. fulvum</i> Sibth. y Sm.		Silvestre	

Sin embargo, muchos autores consideran sólo dos especies de *Pisum*: *P. fulvum* y *P. sativum*, y el taxón *abyssinicum* es clasificado como una subespecie de *P. sativum* (Davis, 1970; Zong *et al.*, 2009 a,b). El taxón *abyssinicum* presenta características fenotípicas propias, tales como floración temprana, una adaptación útil para evitar los períodos de sequía y folíolos fuertemente aserrados; así como también alelos propios en *loci* particulares (Smýkal *et al.*, 2015).

El acervo genético primario incluye a la especie *P. sativum*, aunque existen dentro del taxón barreras de fertilidad unilateral causadas por incompatibilidad núcleo-citoplasmática (Bogdanova *et al.*, 2009); mientras que, el acervo genético secundario generalmente incluye a las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum* (Smýkal *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2015). El acervo genético primario corresponde al concepto tradicional de especie biológica; dentro de él los híbridos suelen ser fecundos y la transferencia de genes resulta fácil. El acervo genético secundario está formado por las especies emparentadas a la especie biológica en cuestión que pueden cruzarse para producir por lo menos una descendencia fecunda. La transferencia de genes es posible, pero menos fácil, puesto que muchos híbridos son estériles o es difícil que alcancen la madurez (FAO, 1998).

En la especie *P. sativum* L. suelen considerarse taxonómicamente cinco subespecies: la ssp. *sativum* representada por formas cultivadas, la ssp. *elatius* y la ssp. *jomardii*, con formas silvestres, y la ssp. *transcaucasicum* y ssp. *asiaticum*, representadas ambas por formas cultivadas y silvestres (NCBI Taxonomy, 2015). Dentro de la ssp. *sativum* hay seis variedades domesticadas: var. *sativum*, var. *macrocarpon*, var. *arvense*, var. *choresmicum*, var. *ponderosum* y var. *tibeticum*.

La variedad botánica *sativum*, comúnmente llamada *garden pea* o arveja, incluye un gran número de cultivares diversos que presentan, en su mayoría, flores de color blanco. La variedad botánica *macrocarpon*, usualmente denominada cometodo o *sugar pea*, presenta vainas comestibles, debido a la falta de fibra en la unión de sus valvas (pericarpio) y carencia de endocarpio. Los cultivares de esta variedad tienen flores de color blanco o púrpura. La var. *arvense*, conocida como arveja forrajera o *field pea*, presenta flores usualmente de color púrpura. Aunque las variedades *macrocarpon* y *arvense* contienen un menor número de cultivares en comparación a la var. *sativum*, pueden ser clasificadas en varios subgrupos (en especial la var. *arvense*), según caracteres que dependen de la presencia de antocianina (Green, 2008).

Si bien la clasificación taxonómica del género *Pisum* ha ido cambiando a lo largo del tiempo, continúa siendo confusa en la actualidad (Vershinin *et al.*, 2003; Kosterin y Bogdanova, 2008; Smýkal *et al.*, 2015).

2. MORFOLOGÍA

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

La **raíz** es pivotante, con numerosas raicillas secundarias y terciarias, presenta sobrecrecimientos denominados nódulos que contienen bacterias nitrificantes. (Enciclopedia Agropecuaria Terranova, 1998).

Los **tallos** son trepadores, angulosos y ligeramente estriados. Con respecto al desarrollo vegetativo, existen variedades de crecimiento determinado e indeterminado, dando lugar a tres tipos de variedades: enanas, de medio enrame y de enrame (PROMOSTA, 2005). De este modo, la altura de la planta puede ser de 0,3 a 2 metros según la variedad.

Sus **hojas** son compuestas y paripinadas, y consisten de estípulas basales grandes, seguidas generalmente de uno a tres pares de folíolos proximales y terminan en zarcillos ramificados. Las estípulas, de tamaño mayor que los folíolos, se insertan en la base del pecíolo de la hoja.

Las variedades que presentan los genes mutantes recesivos *af*, *st* y *tl* en estado de homocigosis, muestran modificaciones en la forma y el tamaño de los folíolos y estípulas (Blixt, 1972; Marx, 1977, 1987; Smith y Hake, 1992, 1994; Murfet y Reid, 1993; Hofer y Ellis, 1998). Las variedades semiáfílas presentan el gen *af* en homocigosis (*afaf*), que se expresa transformando los folíolos en zarcillos manteniendo las estípulas en su forma normal. El gen *st* en homocigosis (*stst*) reduce el tamaño de las estípulas considerablemente. Las variedades áfilas presentan ambos genes mutados (*afaf stst*), y son plantas que sólo tienen zarcillos y estípulas muy reducidas. Por su parte el gen *tl* en homocigosis (*tltl*) transforma todos los zarcillos en folíolos.

Las **flores** zigomorfas pueden ser solitarias o en inflorescencias pedunculadas de hasta tres flores, y se insertan por medio de un largo pedúnculo en la axila de las hojas. Las flores son pentámeras; el cáliz es gamosépalo de color verde pálido y muy persistente. La corola está formada por pétalos irregulares llamados alas, estandarte y quilla. El estandarte y la quilla pueden ser blancos, rosados, lilas, naranjas o verdes; y las alas, púrpuras a blanquecinas, naranjas o verdes.

Los **frutos** son vainas alargadas y oblongas de color verde generalmente. Las vainas son algo comprimidas y terminan en una pequeña curva. Los frutos presentan un número variable de semillas casi esféricas, cuyos tamaños también son variables. Los granos pueden ser lisos o rugosos y con color de cotiledón, verde, amarillo o naranja.



Figura 1: Ilustración de una planta de arveja (Fuente: wikipedia.org).

3. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE *P. sativum*

Económicamente, las leguminosas se ubican como la segunda familia más importante de plantas cultivadas luego de la familia *Poaceae*, que representa aproximadamente el 27% de la producción agrícola del mundo (Graham y Vance, 2003).

La arveja (*Pisum sativum* L.) es una leguminosa valiosa que es cultivada y consumida ampliamente en todo el mundo, cuyas semillas son ricas en proteínas (23-25%), almidón (50%), azúcares solubles (5%), fibras, minerales y vitaminas (Bastianelli *et al.*, 1998). Las legumbres aportan alrededor de un tercio de la ingesta de proteínas de la humanidad.

Además, la arveja sirve como una fuente importante de alimento y forraje para los animales (Smýkal *et al.*, 2012). A nivel mundial el uso de arvejas forrajeras es sumamente

importante. Se las utiliza para la alimentación de cerdos y en tambos dedicados a la producción de quesos.

Uno de los atributos más importantes de las legumbres, es su capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno, lo cual pone de manifiesto su importancia como fuente de nitrógeno en los ecosistemas naturales y agrícolas (Phillips, 1980). 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).

Según la FAO (FAOSTAT, 2015) a nivel mundial, en el 2013, 95 países fueron productores de arvejas para grano seco, con una producción total de 10.979.946 toneladas. El principal país productor de arveja seca fue Canadá con 3.849.300 toneladas (35%); y le siguen en orden de importancia China (13%), Rusia (12%), Estados Unidos (6%) e India (5%).

Con respecto a la demanda de arveja seca, los principales países importadores son India, China y Bangladesh. India es el principal consumidor de arvejas de granos amarillos.

A nivel nacional, para la campaña 2012/13, la superficie sembrada de arveja fue de 50.530 ha y la cosechada alcanzó las 46.890 ha con una producción de 70.951 toneladas. En la campaña 2013/14 estos números fueron algo superiores. La superficie sembrada fue de 51.495 ha y la cosechada 51.445 ha, alcanzándose una producción de 73.677 toneladas (De Bernardis, 2014).

El consumo interno se ubicó en torno a las 10.000 a 13.000 toneladas; el resto se exportó a Europa, especialmente a España, siguiendo en orden de importancia la India y Brasil. La forma de exportación fue como grano embolsado o como arveja forrajera cuando existieron problemas de calidad.

En nuestro país, el cultivo de la arveja tiene su mejor desarrollo productivo en el sudeste de Santa Fe y noreste de Buenos Aires. Según Prieto (2013), la producción de arveja se ha duplicado en la última década aumentando la exportación casi 10 veces; por lo que Argentina ha logrado posicionarse como un proveedor de arveja en todo el mundo. El aumento de la producción ha sido generado por la creciente demanda para la exportación, y, paralelamente,

por la intensificación que se puede implementar en las rotaciones al incluir esta legumbre en las secuencias de cultivo.

Sin embargo, el país no ha desarrollado todo su potencial dado que sólo produce y exporta principalmente arveja de grano verde (variedades Viper y Facón), mientras que la mayor demanda mundial es de arvejas con cotiledones amarillos.

4. CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

4.1. Recursos fitogenéticos

A pesar de la importancia del cultivo de arveja, la diversidad genética de esta especie comenzó a erosionarse con la introducción de variedades comerciales uniformes y mucho más adaptadas a las técnicas modernas de cultivo y a los nuevos sistemas de comercialización. La situación agrícola actual posee una creciente demanda por nuevas alternativas productivas, existiendo una tendencia generalizada en todas las partes del mundo a la obtención de variedades uniformes y con alto rendimiento que reemplacen a las variedades tradicionales. De esta forma, se fueron desplazando a variedades tradicionales, heterogéneas y menos productivas, pero altamente adaptadas a su ambiente local y poseedoras de una gran variabilidad (FAO, 2010). Esta pérdida de variabilidad genética implica una limitación de la capacidad de responder a nuevas necesidades y a un incremento de la vulnerabilidad frente a factores bióticos y abióticos. La utilización de estas nuevas variedades genera, en forma indirecta, un alto costo productivo; ya que la disminución de la variabilidad genética trae aparejado una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades que, cuando aparecen en el cultivo, diezman el rendimiento del mismo. Es esencial, entonces, desarrollar mecanismos que permitan utilizar activamente los recursos genéticos como fuente de diversidad genética útil para la obtención y mejora de variedades.

La diversidad genética que tiene algún uso actual o potencial se considera un recurso genético (Cubillos, 1994). Los recursos genéticos vegetales o recursos fitogenéticos, reducen el universo de la diversidad genética a aquel relacionado con la flora. Estos recursos constituyen una importante fuente de diversificación, pues permiten la generación de nuevos productos. Según Frankel (1984), se consideran recursos genéticos vegetales: las especies silvestres y primitivas de las plantas cultivadas, las razas o variedades locales (*landraces*), los cultivares

obsoletos, los cultivares modernos y los genotipos especiales. De esta manera, los recursos genéticos de un cultivo consisten de la variación genética total que existe en la especie. Por su parte, Esquinas (1981) y Chang (1994), definen los recursos genéticos como el material genético de plantas, animales y otros organismos que determina sus características y, por ende, su habilidad para adaptarse y sobrevivir. Hawkes (1991) planteó que los recursos fitogenéticos constituyen los genotipos o poblaciones de cultivares que se mantienen en forma de semillas, tejidos, plantas, etc. Hidalgo (1991) los definió como la suma de todos los genes resultantes de la evolución de una especie y comprenden desde especies silvestres con potencial agrícola hasta genes clonados.

Según la FAO, los recursos genéticos de un país están compuestos por los medios con que cuenta para satisfacer sus necesidades actuales y futuras, los cuales constituyen una parte indisoluble de su patrimonio nacional (FAO, 1996b). El término recursos genéticos encierra la implicación de que el material que se conservará tiene o puede tener valor económico utilitario (FAO, 1996a); por lo que incluye cultivares tradicionales, cultivares modernos, plantas silvestres afines y otras especies silvestres que pueden ser utilizadas para la alimentación, fibras, ropas, energía, entre otros. La FAO, desde 1960, inició la tarea de concientizar a las instituciones sobre la necesidad de preservar los recursos genéticos para, por un lado, tener herramientas con el fin de aliviar la cada vez más grave escasez de alimentos y, por otro, salvar la variabilidad de aquellas especies cultivadas que se encuentran sometidas a un proceso de erosión génica en los centros de origen y de diversidad. Así nacieron los bancos de germoplasma en los centros internacionales de investigación agrícola.

Actualmente, si bien la mayor parte de los recursos económicos destinados a la conservación de recursos genéticos están orientados a los cultivos comerciales; progresivamente se van incrementando los esfuerzos por conservar, también, la flora silvestre. Esto último se debe al uso potencial desconocido de las formas silvestres y a su importante rol en la estabilidad global de los ecosistemas.

Por otro lado, en la Cumbre para la Tierra celebrada en Río de Janeiro en 1992 (conocida por Cumbre de Río), se reconoció internacionalmente el hecho de que la protección del medio ambiente y la administración de los recursos naturales deben integrarse en las cuestiones socio-económicas de pobreza y subdesarrollo. Esta idea ha sido recogida en la definición del término 'desarrollo sostenible' como 'el desarrollo que satisface las necesidades

del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades. Gracias a estas nuevas ideas se consiguieron importantes logros, siendo uno de ellos la firma del Convenio sobre Diversidad Biológica, acuerdo legalmente vinculante, que hasta la fecha ha sido firmado por 168 países (entre ellos, Argentina) y que representa un paso importantísimo hacia la conservación de la diversidad biológica, del uso sostenible de sus componentes y del reparto justo y equitativo de los beneficios derivados del uso de recursos genéticos.

Una contribución importante a la aplicación del Convenio sobre la Diversidad Biológica en las esferas de la alimentación y la agricultura fue la implementación del Plan de Acción Mundial (PAM), para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación (RFAA), firmado en la Cuarta Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, realizada en Leipzig en el año 1996. Como país firmante de esta iniciativa, Argentina se comprometió a adoptar las medidas necesarias para su aplicación, de acuerdo a las capacidades nacionales, mediante, la firma de una carta acuerdo en julio del 2006 entre la FAO y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), designado como Punto Focal Nacional para el seguimiento de la aplicación del PAM.

4.2. Clasificación de las Colecciones de germoplasma

Con respecto a la conservación de la diversidad genética, *Bioversity International* (ex IBPGR, 1991) define una colección de germoplasma como una colección que mantiene genotipos, genes o alelos de una especie en particular obtenidos de fuentes o locales ecogeográficos diferentes, organizados con una estructura adecuada para promover su conservación y utilización como fuente de material genético para los trabajos de mejoramiento genético (EMBRAPA, 1996).

Según Jaramillo y Baena (2000), la colección de germoplasma es una congregación de accesiones representativas de una variación genética objetivo de conservación y/o utilización. También ha sido utilizado el término colecciones de recursos fitogenéticos vegetales para indicar una colección que mantiene accesiones de una especie o varias especies de interés y de los parientes silvestres relacionados (EMBRAPA, 1996).

Las colecciones de germoplasma *ex situ*, es decir fuera de los ecosistemas naturales, se pueden clasificar como:

- Colección base,
- Colección activa,
- Colección de trabajo,
- Colección núcleo

La **Colección base** comprende un conjunto de accesiones, cada una de las cuales debe ser distinta de las otras y lo más parecida posible a la muestra original en cuanto a la integridad genética. Esta colección se caracteriza por ser conservada a largo plazo a través de la utilización de procesos de frigorificación con humedad relativa entre 4 y 6%, a temperaturas de -18 y -20°C . La colección base, no es utilizada como fuente de distribución rutinaria; es decir que en principio, las accesiones no se pueden distribuir directamente a los usuarios a partir de la colección base. Esta colección constituye la principal fuente de variabilidad genética para la especie de interés, por incluir las accesiones de interés científico, tecnológico, socioeconómico y cultural para la demanda actual.

La **Colección activa** puede comprender las mismas accesiones que la colección base, pero se conserva a mediano plazo con temperaturas por encima de 0°C y por debajo de 15°C . Además, está disponible para las actividades del banco y distribución a usuarios. De este modo, mantiene el germoplasma con demanda actual en multiplicación inicial, regeneración, caracterización y evaluación. Los procedimientos de incorporación y descarte de accesiones se realizan continuamente.

La **Colección de trabajo** o colección del mejorador, se establece para suministrar germoplasma a investigadores, instituciones o programas de investigación y/o mejoramiento.

Una **Colección núcleo (CC)** es una muestra estructurada de una colección completa. Está estructurada de tal manera que representa la diversidad genética de la colección completa en un conjunto reducido de accesiones. La colección núcleo se establece para facilitar el manejo y fomentar la utilización del germoplasma. Esta colección permite detectar duplicados en la colección completa y establecer prioridades para caracterizar y evaluar las muestras; además, ofrece fácil acceso a los materiales conservados. En la siguiente sección se retoma y profundiza este concepto.

5. COLECCIÓN NÚCLEO

En los últimos 25 años ha habido enormes progresos en la colecta y conservación de los recursos genéticos; tanto es así que muchos bancos de germoplasma vegetal enfrentan hoy grandes problemas de espacio y organización. El gran tamaño de las colecciones en los bancos de germoplasma, genera problemas para su conservación y dificulta el uso de la diversidad genética que contienen; resultando así en contra de los objetivos para los cuales se establecieron (van Hintum *et al.*, 2000). No solo se generan inconvenientes relacionados a la gestión de los bancos de germoplasma (Marshall, 1989); sino que también ocurre una escasa difusión de la información existente (Mackay, 1995) y una falta de cooperación entre curadores de bancos de germoplasma y mejoradores (Morales *et al.*, 1997).

A partir de esta problemática, la formación de colecciones núcleo (CCs) surge como una opción interesante para afrontar los inconvenientes mencionados. Inicialmente, Frankel (1984) definió una colección núcleo (CC) como un conjunto limitado de accesiones que, empleando un mínimo de repeticiones, representa la diversidad genética de una especie cultivada y de sus parientes silvestres.

Para el caso de un banco de germoplasma, una colección núcleo consta de un número limitado de las accesiones de una colección, que se escogen para representar el espectro genético de dicha colección. Debe incluir el máximo de diversidad genética presente en la colección completa. Este conjunto, conformado por un conjunto de accesiones, se ha denominado también "subconjunto núcleo" de la colección completa (Brown, 1995).

En el caso de una especie cultivada, una colección núcleo consiste en un número limitado de entradas seleccionadas para representar la diversidad genética de toda la especie cultivada y de sus parientes silvestres. Una colección núcleo es sintética e integral, siendo el resultado de la cooperación conjunta de los bancos de germoplasma nacionales e internacionales. La misma puede ser complementada, cuando se requiere llenar vacíos, con muestras de poblaciones silvestres o cultivadas.

El establecimiento de colecciones núcleo es una estrategia efectiva para optimizar los recursos financieros, materiales y humanos al proveer una eficiencia mayor en el uso de las colecciones de germoplasma (Spagnoletti-Zeuli y Qualset, 1993; van Hintum *et al.*, 2000).

La principal característica y ventaja de las CCs es su reducido tamaño; lo que lleva a que puedan ser evaluadas más detalladamente que una colección completa (Basigalup, 1991), permitiendo una elección más efectiva de los materiales a utilizar, por ejemplo, en un programa de mejoramiento (van Hintum, 1999; Spagnoletti Zeuli y Qualset, 1995). Esta estrategia implica un cambio en la organización de la colección, estableciendo dos niveles jerárquicos: la colección núcleo y la colección de reserva (Brown, 1989a). Las accesiones que no son incluidas en la colección núcleo se conservan como una colección de reserva.

Basado en esto, los curadores de los bancos de germoplasma pueden poner mayor prioridad en las actividades de conservación, como pruebas de germinación y regeneración, en las accesiones de la CC. Asimismo, las decisiones sobre el crecimiento de la colección pueden ser guiadas por la CC, permitiendo identificar duplicaciones o áreas con escasa representación dentro de la colección. La CC es también el primer paso lógico para buscar alelos deseables; pero si es necesario, en una segunda etapa, la búsqueda es continuada en la colección de reserva.

Finalmente, cabe mencionar que el Plan de Acción Mundial para la Conservación y Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1996b) recomienda el establecimiento de colecciones núcleo como una actividad necesaria para mejorar el uso de los recursos fitogenéticos.

5.1. Elaboración de una Colección Núcleo

El procedimiento general para conformar una colección núcleo es:

1. Identificar el material o la colección que se va a representar, lo cual depende del material disponible y de los objetivos por los cuales se establece la CC.
2. Decidir el tamaño que tendrá la CC, es decir, el número de entradas que contendrá. Este debe ser tal que permita retener en la CC la mayor cantidad de alelos posibles. Brown (1989a) recomienda un 10% de la colección total; ya que este autor determinó que una muestra del 10% de la población retiene, con un 95% de confianza, por lo menos un 70% de los alelos presentes en ella.

Yonezawa et al. (1995) concluyeron que la fracción de una muestra óptima depende del grado de redundancia genética existente entre las accesiones, de los recursos disponibles para mantener las entradas de la CC, y de la frecuencia de regeneración de las entradas. Los autores sugirieron que la proporción óptima de accesiones a ser conservadas oscila entre 20-30%.

Otra cuestión a considerar es que la proporción de muestreo debe variar de acuerdo con el número de accesiones iniciales (Li *et al.*, 2003). De este modo, esta proporción tiene que ser mayor cuando el número de accesiones de la colección inicial es pequeña, y debe ser menor cuando dicho número es grande. En la práctica, la mayoría de las colecciones núcleo constan de entre 5% y 20% del tamaño de las colecciones de las cuales se extrajeron.

3. Dividir el conjunto de materiales en grupos diferenciados genéticamente. En este proceso de estratificación, los grupos deben conformarse de tal manera que se maximice la variación entre uno y otro, y se reduzca al mínimo la variación dentro de ellos.

Para establecer grupos de accesiones similares puede utilizarse el análisis de variables múltiples o análisis multivariado (Crossa *et al.*, 1995), pudiendo en función de datos de caracteres agromorfológicos o moleculares, construir un dendrograma y agrupar las accesiones usando un conjunto de diferentes métodos analíticos incluyendo el de conglomerados, el de discriminantes o el de componentes principales.

4. Decidir el número de entradas que se incluirá en cada grupo. En términos generales, se han aplicado tres enfoques para tal fin:
 - Asignar las entradas al grupo según el tamaño o el número de accesiones presente en cada grupo.
 - Fundamentar la asignación de entradas basándose en la diversidad de marcadores genéticos que hay dentro de los grupos.
 - Tomar en cuenta para la asignación las necesidades de los usuarios o el conocimiento informal.

Cabe aclarar que, en esta tesis, se utilizarán como sinónimos los términos de “accesión” y “entrada”, ya sea para referirse a una muestra mantenida en la colección completa o para referirse a cualquier muestra elegida para formar parte de la CC.

5. Elegir qué entradas de cada grupo conformarán realmente la CC. A esta altura del procedimiento, la colección se encontrará dividida en muchos grupos pequeños con accesiones similares y se habrá definido cuántas entradas se van a elegir en cada grupo.

Finalmente, la CC debe ser validada para asegurar su representatividad y utilidad al evaluar si las características y la diversidad de la colección entera han sido mantenidas. La validación también permite testear si se cumplió el objetivo de evitar la repetición. En el proceso de validación de la CC es aconsejable compararla con la colección original empleando tanto características que intervinieron en el desarrollo de la CC, como aquellas que no se emplearon en ese proceso (Ortiz *et al.*, 1999).

La Colección Núcleo elaborada debe ser dinámica y evolucionar junto con la colección original (Jaradat, 1995), ya que necesita ser mejorada en la medida que aparezcan nuevas accesiones que aporten variabilidad genética (Basigalup, 1991).

6. *Pisum*: DIVERSIDAD GENÉTICA Y CONSERVACIÓN

La estimación de la diversidad genética y la determinación de las relaciones genéticas entre las accesiones de una colección, ayuda a asegurar que el germoplasma se gestiona de manera eficiente. Además, comprender la diversidad genética presente dentro de una especie cultivada, puede generar información valiosa para los programas de mejoramiento y es importante para la protección de variedades vegetales.

Actualmente, en los bancos de genes nacionales de, al menos, 15 países existen colecciones importantes de *Pisum* con más de 2000 accesiones (Tabla 2), junto con muchas otras colecciones más pequeñas en todo el mundo (Smýkal *et al.*, 2011; Coyne *et al.*, 2011). Sin embargo, existe un alto nivel de duplicaciones entre dichas colecciones, dando una impresión errónea del verdadero nivel de diversidad genética (Maxted *et al.*, 2010; Smýkal *et al.*, 2011; Coyne *et al.*, 2011). Todavía hay importantes vacíos y falta de información en las colecciones, sobre todo con respecto a los materiales silvestres y localmente adaptados; lo cual necesita ser abordado antes de que estos recursos genéticos se pierdan para siempre (Maxted *et al.*, 2010). Con el aumento en la frecuencia de los fenómenos meteorológicos extremos que afectan a la producción agrícola, la colecta de germoplasma adaptado a esas condiciones climáticas, como

así también de genotipos resistentes a enfermedades y plagas, es una prioridad (Upadhyaya *et al.*, 2011).

Muchos estudios han sido llevados a cabo sobre colecciones de germoplasma de *Pisum* para investigar la diversidad genética. Varias de las grandes colecciones de germoplasma de arveja en el mundo fueron analizadas utilizando métodos moleculares y, seguidamente, las colecciones núcleo fueron elaboradas (Tabla 2). Por ejemplo, la diversidad genética de más de 2000 accesiones de la colección china fue evaluada usando 21 SSR (*Simple Sequence Repeats*) o microsatélites (Zong *et al.*, 2009a). En base a esta información, Zong *et al.* (2009a) generaron una primera CC. Esta fue comparada contra otra CC conformada utilizando como criterio de clasificación la distribución geográfica dentro de China. El primer criterio (la información molecular) mostró mayor diversidad genética y representatividad.

Por su parte, el banco de semillas de USDA-ARS, inicialmente elaboró una CC formada por 504 accesiones basándose en el origen geográfico y el color de la flor (Simon y Hannan, 1995). Posteriormente, mediante la incorporación de datos tales como concentración de proteínas de la semilla, composición de nutrientes minerales de la semilla y biomasa, detectaron redundancia y lograron disminuir aún más el tamaño de la CC (Coyne *et al.*, 2005). Además, 310 accesiones de arveja de USDA fueron analizadas utilizando 15 marcadores SSR y 37 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); e INRA de Francia utilizó un amplio set de 121 marcadores isoenzimas, RAPD, EST (*Expressed Sequence Tags*) y SSR sobre 148 accesiones (Baranger *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2012).

Estudios adicionales incluyen: el análisis de 60 cultivares de arveja en Canadá con marcadores SSR, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) y RAPD (Tar'an *et al.*, 2005); el análisis de la colección entera de germoplasma de arveja de JIC (3029 accesiones) consistiendo de cultivares (33%), *landraces* (19%), accesiones silvestres (13%) y stock genético (26%), usando 45 marcadores RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*); y el análisis genotípico de 1283 accesiones de arveja de la colección nacional Checa (CzNPC) utilizando una combinación de 10 SSR y 25 RBIP (Ford *et al.*, 2002; Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2008b; Zong *et al.*, 2009a; Jing *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2012).

La conservación del germoplasma de *Pisum* debe tener una base científica y estar coordinada internacionalmente. El punto clave es la recolección y conservación *ex situ* de

landraces y variedades de cada país. El objetivo general es garantizar el mantenimiento de la variación asociada a la adaptación de la gama de ambientes agroecológicos, los usos finales (hojas, semillas inmaduras y las vainas y semillas en seco), y los sistemas de producción (He *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2008). Las formas silvestres están representadas en menos del 3% en las distintas colecciones nacionales a pesar de su amplia diversidad genética. Es prioritario evaluar esta variación considerando que los hábitats naturales se están perdiendo, debido al aumento de la población humana, el aumento de la presión de pastoreo, la conservación de áreas marginales para la agricultura y las amenazas ecológicas a causa del futuro cambio climático (Snook *et al.*, 2011).

Tabla 2. Lista de las 16 grandes colecciones de germoplasma de *Pisum* del mundo con más de 1000 accesiones.

Código	País	Instituto	Número de accesiones	Sitio Web	Análisis fenotípico	Análisis genotípico	Colección núcleo
VIR	Rusia	N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,	6790	http://www.vir.nw.ru/data	No	No	
USDA	Estados Unidos	Plant Germplasm Introduction and Testing	5400	http://www.ars-grin.gov	Si	Si	Formada
VAR	Italia	Istituto del Germoplasma, Bari	4297	http://www.ba.cnr.it/areagg34/germoplasma	No	No	
SAD	Bulgaria	Institute of Plant Introduction and Genetic	2787	http://www.genebank.hit.bg	No	No	
NGB	Suecia	NordGen, Nordic Genetic Resource Centre, Alnarp	2724	http://www.ngb.se/sest	No	No	
CGN	Holanda	Centre for Genetic Resources, Wageningen	1008	http://www.cgn.wur.nl/pgr/	No	No	
ATFC	Australia	Australian Temperate Field Crop Collection,	6567	http://www2.dpi.qld.gov.au/extra/asp/AusPGRIS	Si	Si	Formada
ICARDA	Siria	International Center for Agricultural Research in	6105	http://www.icarda.cgiar.org	No	No	
GAT	Alemania	Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant	5336	http://fox-serv.ipk-gatersleben.de/	No	No	
ICAR	China	Institute of Crop Sciences, CAAS China	3837	http://icgr.caas.net.cn/cgris	Parcialmente	No	
JIC	Reino Unido	John Innes Centre, Norwich	3557	http://www.jic.ac.uk/GERMPLAS/pisum	Si	Si	Formada
WTD	Polonia	Plant Breeding and Acclimatization Institute	2899	http://www.ihar.edu.pl/gene_bank	No	No	
INRA	Francia	INRA CRG Légumineuse à grosses graines, Dijon	1891	http://195.220.91.17/legumbase/	Parcialmente	Si	Formada
UKR	Ucrania	Yurjev Institute of Plant Breeding, Kharkov	1671	http://www.bionet.nsc.ru	No	No	
CZE	República Checa	AGRITEC, Research, Breeding and Services Ltd.,	1284	http://genbank.vurv.cz/genetic/resources	Si	Si	Formada
HUN	Hungría	Institute for Agrobotany, Tapiosele	1188	http://www.rcat.hu	No	No	

7. MARCADORES GENÉTICOS

El término marcador genético hace referencia a cualquier carácter que se herede de manera mendeliana y que permita demostrar diferencias (polimorfismos) entre individuos o entre especies, actuando como “señales” indicadoras de diversas regiones del genoma y ocupando una posición específica dentro de un cromosoma. Constituyen una herramienta esencial en estudios de genética evolutiva, poblacional, diversidad genética, identificación de variedades, desarrollo de mapas de ligamiento, 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 aquellos 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 (Jones *et al.*, 1997; Winter y Kahl, 1995).

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.*, 2007b; Smýkal *et al.*, 2008a,b; Pacheco *et al.*, 2009; Espósito *et al.*, 2009; Sarikamis *et al.*, 2010; Gatti *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2014).

Sin embargo, algunas características no son evidentes durante las fases tempranas del desarrollo. Asimismo, el número de caracteres registrables es reducido, se observa un nivel bajo de polimorfismos, una frecuencia considerable de dominancia alélica y un control poligénico con marcada influencia ambiental.

7.1.1. Interacción Genotipo por Ambiente

El Ambiente incluye un conjunto de factores que afectan el crecimiento y/o desarrollo de una planta. Este abarca todos los efectos predecibles edáficos (química y física del suelo) y climatológicos (radiación solar, fotoperíodo), y los efectos no predecibles, tanto climatológicos (lluvias, humedad relativa del aire, temperatura) como biológicos (insectos, enfermedades, agentes simbióticos). La probabilidad de que estas condiciones se repitan en dos sitios diferentes se considera casi nula.

Los cambios en el ordenamiento de los cultivares al cambiar el ambiente, indican la presencia de interacción genotipo x ambiente y la ausencia de estabilidad para el carácter en cuestión. Esto significa que el genotipo A puede ser superior al genotipo B en el ambiente X, pero inferior en el ambiente Y. Además, si no existiera influencia del ambiente sobre un carácter en particular el valor genotípico sería igual al fenotípico.

En un sentido más amplio, podríamos expresar que el fenotipo (P) es producto de considerar el genotipo (G) más el efecto del ambiente (A) y de la interacción genotipo por ambiente (GxA); es decir,

$$P = G + A + GxA$$

La magnitud de la interacción GxA puede ser estimada mediante el análisis de varianza de un conjunto de individuos repetidos en diferentes localidades y años.

A su vez, la presencia de interacción GxA, introduce incertidumbre sobre los valores fenotípicos medidos sobre un genotipo a través de varios ambientes (De la Vega *et al.*, 2001); lo que podría llevar a un error al afirmar que determinadas accesiones presentan o no variabilidad genética.

7.2. Marcadores bioquímicos

Los principales marcadores bioquímicos son los enzimáticos, los cuales utilizan la presencia de variantes alélicas de enzimas funcionalmente idénticas, pero codificadas por genes distintos denominadas isoenzimas. Siendo estas enzimas productos directos de una componente genética, presentan una menor influencia por parte del ambiente, constituyendo un

instrumento más eficaz respecto de la selección morfológica. Además de las isoenzimas, puede ser empleado como marcador bioquímico el contenido de proteínas de reserva del endosperma, lo que se evalúa a través de la técnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

Las principales desventajas de los marcadores bioquímicos y 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). Pese a estas limitaciones, los marcadores morfológicos y enzimáticos han sido ampliamente utilizados para investigar la diversidad genética presente en arveja (Baranger *et al.*, 2005; Tar'an *et al.*, 2005; Smykal *et al.*, 2008 a,b; Pacheco *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2009 a,b, Haider *et al.*, 2013).

7.3. Marcadores moleculares

El continuo avance de la biología molecular permitió la generación de distintos marcadores moleculares, mediante los cuales se logró superar 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 genómico y puede ser definido como un locus genómico, detectable con sondas o cebadores específicos que, en virtud de su presencia, revela de un modo característico e inequívoco un segmento cromosómico con el cual se identifica a la región que lo circunda en el extremo 5' y 3' (Barcaccia *et al.*, 2000). Presentan numerosas ventajas, tales como 1) no están influenciados por el ambiente, 2) exhiben un alto nivel de polimorfismo y no presentan 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) y 5) 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. Además permiten incrementar la eficiencia del proceso de selección en los programas de mejoramiento debido a que pueden ser utilizados en estadíos tempranos del desarrollo.

Entre los marcadores basados en el ADN, la técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) fue la primera en desarrollarse, pero su uso está decreciendo constantemente debido a su alta complejidad y consumo de tiempo. La mayor parte de las metodologías

actualmente en uso están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se han desarrollado numerosos marcadores de este tipo, cada uno con diferentes grados de complejidad, costo, repetibilidad y capacidad para generar información. El uso de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) resulta un método sencillo, rápido y no requiere información previa de la secuencia del genoma, pero es sensible a condiciones variables y por lo tanto de baja consistencia y repetibilidad, lo que limita su uso (Welsh y McClelland, 1990; Barcaccia, 1994; Haider *et al.*, 2013). La técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) es ampliamente utilizada para caracterización de ADN genómico (Zhang *et al.*, 1999; Karaca *et al.*, 2002) debido a su elevada reproducibilidad, robustez y gran poder de detección de la variabilidad (Vos *et al.*, 1995); sin embargo, resulta un método complejo ya que requiere la optimización de las condiciones en cada uno de sus pasos que incluyen digestión, ligación y amplificación del ADN.

Recientemente, evaluaciones de la diversidad genética presente en las colecciones europeas de germoplasma de *Pisum*, utilizando RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) y marcadores SSAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*) fueron realizadas por Jing *et al.* (2012); ratificando la estructura genética de *Pisum* previamente determinada (Jing *et al.*, 2010).

7.3.1. Marcadores Microsatélites

Los marcadores microsatélites (SSR, *Simple Sequence Repeats*) 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 tanto nuclear como organelar (Goldstein y Pollock, 1997). 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 (Toth *et al.*, 2000). Estas repeticiones son el producto de un deslizamiento (*slippage*) de las hebras debido a que la ADN polimerasa continúa el copiado normalmente, así, el número total de secuencias de repetición polimerizadas varía, obteniéndose una hebra hija más larga si el *loop* se formó en la hebra sintetizada y una más corta si el *loop* se formó en la hebra molde.

Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en el análisis de la diversidad genética de especies cultivadas, y en particular en *Pisum sativum* L (Burstin *et al.*, 2001; Ford *et*

al., 2002; Baranger *et al.*, 2004; Loridon *et al.*, 2005; Dribnokhodova y Gostimsky, 2009; Zong *et al.*, 2009b; Nasiri *et al.*, 2009; Sarikamis *et al.*, 2010; Bouhadida *et al.*, 2013). Esto es debido a sus propiedades: codominancia, naturaleza multi-alélica, abundancia relativa, cobertura extensa del genoma, buena reproducibilidad y fácil detección por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Powell *et al.*, 1996).

Los perfiles electroforéticos de SSR son simples de analizar debido a las pocas bandas que se obtienen las cuales son altamente informativas debido a la existencia de múltiples alelos en una población y su naturaleza codominante. Además, SSR brinda la posibilidad de realizar multiplex-PCR incrementando la información obtenida en cada experimento reduciendo tiempo y costos (Casadevall *et al.*, 2011). Sin embargo, para amplificar un SSR particular es necesario conocer las secuencias flanqueantes de manera de poder diseñar cebadores SSR apropiados. Esto puede ser costoso y demandar mucha labor y tiempo por lo que el uso de esta tecnología depende de la disponibilidad de cebadores. Una biblioteca de marcadores microsatélites específicos de arveja fue previamente desarrollada Burstin y Loridon (Burstin *et al.* 2001; Loridon *et al.* 2005), por lo que esto último no es una variable limitante para esta especie.

7.3.2. Marcadores SRAP

La técnica denominada SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*), ha sido reconocida como un sistema de marcadores moleculares de suma utilidad para la caracterización y el análisis de la diversidad genética. Es una técnica simple desarrollada para especies de *Brassica*, (Li y Quirós, 2001) y probada posteriormente en otros cultivos tales como papa, arroz, manzana, *citrus*, cereza, ajo, lechuga y apio (Li y Quiros, 2001), *buffalograss* (Budak *et al.*, 2004), zapallo (Ferriol *et al.*, 2004), alcaucil (Cravero *et al.*, 2007), arveja (Espósito *et al.*, 2007a,b), uva (Guo *et al.*, 2012); lenteja (Bermejo *et al.*, 2014).

Está orientada a la amplificación de marcos abiertos de lectura (Ferriol *et al.*, 2003) y se basa en la amplificación de regiones codificantes del genoma a partir de dos cebadores. 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 directo y AATT en el cebador inverso. La secuencia central es seguida por tres

nucleótidos selectivos en el 3' terminal. La secuencia de relleno de los cebadores directos e inversos 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 inverso 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 (Lin *et al.*, 1999). 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. Como intrones, promotores y espaciadores son secuencias que generalmente se presentan menos conservadas entre individuos, es posible generar bandas polimórficas basadas en intrones y exones (Li y Quiros, 2001).

Esta técnica combina simplicidad, repetibilidad y fácil secuenciación de las bandas selectas. También, ha sido una herramienta útil en la determinación de variedades genéticas entre especies de leguminosas como soja, judía azuki (legumbre de color rojo intenso cultivada en el lejano Oriente) y variedades de poroto (Smutkupt *et al.*, 2006).

Marcadores SRAP y morfológicos fueron utilizados para estimar las relaciones genéticas entre 40 variedades de arveja (Espósito *et al.*, 2007), siendo prácticamente el único estudio con el uso de marcadores moleculares en *Pisum sativum* en nuestro país.

HIPÓTESIS

La caracterización y evaluación de la variabilidad disponible en una colección activa del género *Pisum* mediante marcadores morfológicos, agronómicos y moleculares, permite diferenciar las accesiones conformando grupos de materiales que comparten características similares, y posibilita establecer criterios para la conservación de la diversidad genética a lo largo del tiempo. Por otra parte, el conocimiento de dicha variabilidad maximiza el uso del germoplasma en los programas de mejoramiento al permitir una más fácil selección de potenciales progenitores de cruzas e impedir la presencia de accesiones duplicadas.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la diversidad genética disponible en una colección activa del género *Pisum* para conformar una colección núcleo validada, como una alternativa para impulsar el uso racional del germoplasma.

CAPÍTULO 1:

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS DE UNA COLECCIÓN ACTIVA DEL GÉNERO

PISUM

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los recursos genéticos de una colección activa del género *Pisum* mediante atributos agromorfológicos y por medio de marcadores moleculares.
- Estimar las medidas de variabilidad genética de la colección de *Pisum*.
- Determinar las relaciones genéticas entre las accesiones disponibles de *Pisum*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DEL GERMOPLASMA

Se realizaron colectas de germoplasma en forma de semillas de:

- variedades tradicionales argentinas disponibles en diferentes establecimientos hortícolas de la región productora;
- variedades provenientes de diferentes programas de mejora local (Semillero Ronalb, S.A.) y Cooperativa Agrícola Acebal;
- variedades botánicas de los bancos de semillas del *United States Department of Agriculture* (USDA), del *John Innes Centre* (JIC) y del *International Center for Agricultural Research in the Dry Areas* (ICARDA).

A estos materiales se sumaron los de la colección del plan de mejoramiento que incluye variedades mejoradas localmente; completando en total 126 accesiones o entradas (Anexo, Tabla 1).

2.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FENOLÓGICA Y PRODUCTIVA

2.2.1. Ambientes de evaluación y diseño experimental

En una primera etapa (año 2010), los materiales fueron sembrando en invernáculo con la finalidad de multiplicarlos. Se utilizaron macetas de PVC de 5 litros y riego por micro-aspersión.

En los años 2011 y 2012, 98 accesiones fueron sembradas en el Campo Experimental “J. F. Villarino” de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), 33° 1' LS y 60° 53'LO y 50 m sobre el nivel del mar, en parcelas de 20 plantas con dos repeticiones en un diseño completamente aleatorizado (DCA). Las fechas de siembra en cada año fueron: 14/06/2011 y 07/06/2012. EL espaciamiento entre surcos fue de 0,70 m y entre plantas de 0,05 m. 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.

Posteriormente, se incorporaron a la colección 28 accesiones que se sembraron en el campo en las mismas condiciones mencionadas en los años 2012 y 2013. Las fechas de siembra de cada año fueron: 07/06/2012 y 24/06/2013.

De esta manera, cada accesión de la colección total fue evaluada en dos ambientes (dos años).

2.2.2. Caracteres analizados

En cada campaña a campo se evaluaron un total de 26 descriptores morfológicos, fenológicos y agronómicos (UPOV, 2005). De estos, 10 fueron de tipo cualitativos y 16 descriptores fueron cuantitativos.

-Caracteres morfológicos cualitativos:

- color de la flor (CF): blanco (1), salmón (2), rosado (3), fucsia (4), morado (5);
- borde de la hoja (BH): liso (1), ligeramente aserrado (2), aserrado (3);
- tipo de estípula (E): abrazadora (1), no abrazadora o poco abrazadora (2);
- número de pares de folíolos en el primer nudo floral (NPF);
- color de la vaina (CV): verde (1); violeta (2);
- curvatura de la vaina (curV): ausente (1), media (2), fuerte(3);
- forma de la parte distal de la vaina (disV): puntiaguda (1), roma (2);
- coloración del tegumento del grano seco (CG1): blanco cremoso (1), verde claro (2), verde (3), verde azulado (4), verde amarronado (5), marrón (6), morado (7).
- coloración del tegumento del grano seco (CG2): uniforme (1), no uniforme (2);
- superficie del grano seco (SG): lisa (1), lisa con ligera rugosidad (2), rugosa (3).

-Caracteres morfológicos cuantitativos:

- altura de planta al momento de la cosecha (cm) (AP),
- primer nudo floral (PNF); medido como el número de nudos desde la base de la planta hasta la aparición del primer nudo reproductivo en el tallo principal.
- longitud de la hoja (cm) en el PNF (LH),

- ancho de la hoja (cm) en el PNF (AH),
- longitud de la estípula (cm) en el PNF (LE),
- ancho de la estípula (cm) en el PNF (AE),
- nudo de la primera vaina (NPV); medido como el número de nudos desde la base de la planta hasta el primer nudo con vaina en el tallo principal.
- longitud de la vaina (cm) (LV),
- ancho de la vaina (cm) (AV).

Para estos descriptores cuantitativos se determinó el promedio de 3 plantas por parcela.

-Caracteres fenológicos:

- 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.
- Días a primera vaina (DV): período comprendido desde la siembra hasta la aparición de la primera vaina.
- Días a fin de cosecha (DC): período comprendido desde la siembra hasta que todas las plantas de la parcela experimental alcanzan su madurez total (plantas totalmente secas).

-Caracteres productivos:

- número de vainas por parcela (VP) (considerando 20 plantas por parcela),
- número de granos por parcela (NG) (20 plantas por parcela),
- diámetro del grano (mm) (DG),
- peso de grano seco por parcela (g) (PG) (20 plantas por parcela).

2.2.3. Análisis estadísticos

2.2.3.1. Variables cualitativas

Se calcularon las frecuencias de las distintas categorías para los descriptores cualitativos en la colección de *Pisum*.

2.2.3.2. *Evaluación de la variabilidad entre accesiones para los distintos caracteres cuantitativos en cada ambiente analizado (años 2011, 2012 y 2013)*

Se comprobó el supuesto de distribución normal por medio de la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965) para cada carácter cuantitativo utilizando el programa SAS (SAS Institute, 1997).

Para analizar la variabilidad entre las accesiones (genotipos) se realizaron los Análisis de Variancia (ANOVA) a un criterio de clasificación para cada carácter en los diferentes años (2011, 2012 y 2013). 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 genotipos;

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

2.2.3.3. *Evaluación y estimación del efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para variables cuantitativas*

Se llevaron a cabo Análisis de Variancia combinados, a dos criterios de clasificación, a través de los ambientes evaluados para determinar la significancia en cada caso de los efectos del genotipo, del ambiente y de la interacción genotipo (accesión) x ambiente. Por un lado, se realizó un ANOVA para las 98 accesiones evaluadas en los años 2011 y 2012; y, por otro lado, se llevó a cabo otro ANOVA para las 28 accesiones evaluadas en los años 2012 y 2013. 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;

β_j : efecto del factor ambiente, $j = 1 \dots a$, a (número de ambientes) = 2, $a = 1$ y 2 para los años 2011 y 2012 respectivamente, ó $a = 1$ y 2 para los años 2012 y 2013 respectivamente.

γ_{ij} : interacción genotipo-ambiente;

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

Todos los efectos fueron considerados aleatorios y se procesó mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1997).

La tabla de Análisis de la Variancia para un diseño de tratamientos con dos factores, en un diseño completamente al azar (DCA) toma la siguiente forma:

Fuentes de variación	GL	CM
Genotipos (G)	$g-1$	CMG
Ambientes (A)	$a-1$	CMA
Interacción GxA	$(g-1)(a-1)$	CMGA
Error	$ga(r-1)$	CME

A fin de despejar los efectos genotípicos, se calcularon los valores ajustados para cada descriptor en cada accesión, restando a cada variable de respuesta los efectos del A y de la interacción GxA estimados previamente. De este modo, en cada accesión, los valores fenotípicos ajustados fueron:

$$y^*_{ijk} = y_{ijk} - \beta_j - \gamma_{ij}$$

que es equivalente a :

$$y^*_{ijk} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ijk}$$

Sobre estos datos ajustados (Taba *et al.*, 1998), se aplicaron las técnicas de Análisis Multivariado.

2.2.3.4. Análisis de Componentes Principales

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) mediante el programa *Info-Gen* (Balzarini y Di Rienzo, 2003) para determinar las variables que permiten una mayor

discriminación o diferenciación entre las diferentes accesiones. Para determinar el número adecuado de Componentes Principales (CP) a considerar, se tuvo en cuenta la proporción de la variación explicada por cada CP, la variancia total acumulada y la interpretación biológica de los valores. La interpretación visual de los resultados se obtuvo mediante la construcción de un gráfico bidimensional, usando como ejes a las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2). Debido a que las diferentes variables evaluadas presentan diferentes unidades de medida, como así también diferentes variancias y rangos, las mismas fueron estandarizadas previas al ACP.

2.2.3.5. Análisis de conglomerados

En función de todas las características cualitativas y cuantitativas evaluadas se estimaron las distancias de Gower (Gower, 1971) y mediante el método de conglomerados utilizando el agrupamiento jerárquico promedio (UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) se obtuvo un dendrograma. Para este fin se utilizó el programa InfoGen/P (Balzarini y Di Rienzo, 2003).

La distancia de Gower se utiliza en el caso de variables mixtas. En esta situación cada accesión está caracterizada por p_1 variables continuas, p_2 variables binarias y p_3 variables cualitativas. Se define el coeficiente de similaridad de Gower entre las accesiones i y j de la siguiente manera:

$$s_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^p s_{ijl}}{\sum_{l=1}^p m_{ijl}}$$

donde $p = p_1 + p_2 + p_3$; $s_{ijl} = 1 - |z_{il} - z_{jl}| / RI$; siendo RI el rango de la l -ésima variable continua; $s_{ijl} = 1$ en el caso de coincidencia del tipo presencia-presencia para la l -ésima variable binaria; $s_{ijl} = 1$ en el caso de coincidencia para la l -ésima variable cualitativa, y finalmente m_{ijl} siempre toma el valor 1 salvo en las p_2 variables binarias en que toma el valor 0 ante una coincidencia del tipo ausencia-ausencia. A partir de este coeficiente de similaridad (s_{ij}) se define la distancia de Gower entre las accesiones i y j como $\delta_{ij} = [2(1 - s_{ij})]^{1/2}$.

Se calculó el coeficiente de correlación cofenética, el cual es una medida de la distorsión de datos que provoca el algoritmo para lograr el agrupamiento, y mide la correlación entre las

interdistancias en el dendrograma y las interdistancias en la matriz de distancia sobre la que se aplicó el procedimiento.

Se compararon los valores medios de los grupos conformados a través de la prueba de Duncan (Sokal y Rohlf, 1981).

2.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

2.3.1. Extracción de ADN genómico

Se realizaron las extracciones de ADN genómico de 121 accesiones de la colección de *Pisum* a partir de hojas jóvenes de 5 plantas elegidas al azar dentro de cada accesión. Las extracciones de ADN se realizaron según el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990), partiendo de 0,2 - 0,4 g de tejido vegetal fresco. La cuantificación del ADN se llevó a cabo midiendo el valor de absorbancia a 260 nm, y por electroforesis en geles de agarosa, comparando la intensidad de la fluorescencia de las muestras teñidas con bromuro de etidio con aquellas de un ADN de fago Lambda (48.5 kb).

Todas las técnicas moleculares 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.

2.3.2. Marcadores tipo SSR

Se utilizaron 34 combinaciones de cebadores de microsatélites desarrolladas para arveja por Burstin y Loidon (Burstin *et al.* 2001; Loidon *et al.* 2005). Finalmente, de ese total de microsatélites se seleccionaron para la caracterización molecular 15 SSR (Tabla 1.1); ya que fueron los que permitieron obtener amplificaciones óptimas, en cuanto a la obtención de producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el polimorfismo.

La reacción de PCR (25µl 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.

Tabla 1.1. Secuencias de los cebadores microsátélites utilizados y sus temperaturas de anillado (T).

Nombre	Secuencia cebadores directos	Secuencia cebadores reversos	T (°C)
A9	GTGCAGAAGCATTGTTCAGAT	CCCACATATATTTGGTTGGTCA	56
AA92	AAGGTCTGAAGCTGAACCTGAAGG	GCAGCCCACAGAAGTGCTTCAA	50
AA135	CCGTTACACATCATTAAGATG	TCCATATCCAGATTAGTCAGA	51
AA153	TTTGATAGTCCGACTTTTCCAT	GTGACAAAAGAATTCAAAACGC	51
AA160	AGATAGACATGAGAATGGTGGC	CTGCTCCAACACAAGATAAACA	55
AA205	TACGCAATCATAGAGTTTGAA	AATCAAGTCAATGAAACAAGCA	51
AA355	AGAAAAATTCTAGCATGATACTG	GGAAATATAACCTCAATAACACA	51
AB23	TCAGCCTTTATCCTCCGAACATA	GAACCCTTGTGCAGAAGCATTAA	61
AC58	TCCGCAATTTGGTAACACTG	CGTCCATTTCTTTTATGCTGAG	61
AC74	CCTTAGTGTTCTTCAACTC	ACAGAACCAAGTTATCAATA	55
AD56	GAAACATTGGTTGAAGAGCGAG	GTTGTGCGGTGAACACAAGTAA	61
AD59	TTGGAGAATGTCTTCTCTTTAG	GTATATTTTCACTCAGAGGCAC	51
AD147	AGCCCAAGTTTCTTCTGAATCC	AAATTCGCAGAGCGTTTGTAC	61
AD148	GAAACATCATTGTGTCTTCTTG	TTCCATCACTTGATTGATAAAC	54
D21	TATTCTCCTCCAAAATTCCTT	GTCAAATTAGCCAAATTCCTC	51

Se utilizó un TD 63-58 para los microsátélites: AB23, AC58, AD56, AD147 y un TD 55-50 para los microsátélites: A9, AA92, AA135, AA153, AA160, AA205, AA355, AC74, AD59, AD148, D21.

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 2 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 marcadores SSR fueron considerados como marcadores codominantes y codificados de acuerdo a lo indicado en el manual de uso del programa Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2003). 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*).

2.3.3. Marcadores tipo SRAP

La técnica SRAP se basa en la utilización de 2 cebadores: directo, de 17 bases ricas en GC, y reverso, de 18 bases ricas en AT.

Se utilizaron un total de 10 combinaciones SRAP elegidas al azar (me1-em2, me2-em1, me2-em3, me2-em4, me3-em2, me3-em3, me4-em2, me4-em4, me5-em3, me5-em4) generadas a partir de 5 cebadores directos y 4 reversos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Secuencia de cebadores SRAP utilizados.

Nombre	Secuencia cebadores directos	Nombre	Secuencia cebadores reversos
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'		

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 μ l 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 3,5 a 4 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*).

2.3.4. Análisis estadísticos

2.3.4.1. Medidas de variabilidad genética

Para cada microsatélite se determinó: el número de alelos (A), el número efectivo de alelos (A_e) y la Diversidad Genética (H) (Nei, 1973). Para un locus la Diversidad Genética se calcula como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2$$

donde l es el número de alelos por locus y P_i es la frecuencia del alelo i en la población.

El número efectivo de alelos por locus se calcula como el recíproco de la suma de frecuencias alélicas al cuadrado para el locus en cuestión, $1/\sum_{i=1}^l P_i^2$.

Para marcadores tipo SRAP se determinó el nivel de polimorfismo (%P) y el número de bandas por combinación. Todos los cálculos se realizaron con el programa InfoGen/P (Balzarini y Di Rienzo, 2003).

Para cada uno de los marcadores SSR y SRAP se determinó el Contenido de Información Polimórfica (PIC) el cual se refiere a la utilidad o valor de un marcador para detectar polimorfismo dentro de una población. Depende del número de alelos detectables y la distribución de sus frecuencias y proporciona una estimación de la capacidad de discriminación del marcador (Nagy *et al.*, 2012). Los valores de PIC fueron calculados con el programa PICcalc desarrollado por Nagy *et al.* (2012) que se basa en las siguientes fórmulas:

-Para marcadores codominantes (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2P_i^2 P_j^2$$

donde l es el número de alelos por locus, P_i y P_j son las frecuencias de los alelos i y j en la población. Los valores de PIC oscilan entre 0 y 1 (Botstein *et al.*, 1980; Shete *et al.*, 2000).

-Para marcadores dominantes (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000):

$$PIC = 2 f_i (1-f_i)$$

donde f_i es la frecuencia de las bandas donde está presente el marcador i . Los valores esperados de PIC oscilan entre 0 y 0,5 ya que se asume 2 alelos por locus (De Riek *et al.*, 2001; Honig *et al.*, 2010).

2.3.4.2. Correlación entre SSR y SRAP

Los datos obtenidos con los marcadores SSR y SRAP fueron utilizados para calcular las distancias genéticas entre los distintos materiales. La correlación entre las matrices de distancias genéticas de marcadores SSR y SRAP fue analizada a nivel de: distancias genéticas individuales y distancias grupales, por medio del Test de Mantel de correspondencia de matrices (Mantel, 1967; Smouse *et al.*, 1986; Peakall *et al.*, 1995). Para las distancias grupales se consideraron 8 grupos taxonómicos: *P. fulvum*, *P. abyssinicum*, *P. sativum* ssp. *transcausicum*, *P. sativum* ssp. *elatius*, *P. sativum* ssp. *jomardii*, *P. sativum* ssp. *sativum* var. *arvense*, *P. sativum* ssp. *sativum* var. *macrocarpon* y *P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum*. La significancia estadística fue determinada sometiendo a las matrices a permutaciones aleatorias,

considerando un número de permutaciones de 999. Todos los análisis fueron realizados con el *software* GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

2.3.4.3. *Análisis de Variancia Molecular*

Las matrices de distancias genéticas individuales generadas a partir del conjunto de datos de marcadores SSR y SRAP, fueron analizadas por medio de un Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). El total de variación genética fue particionada en dos niveles: entre los grupos taxonómicos y entre accesiones dentro de los grupos taxonómicos. Se usaron 3996 permutaciones para el cálculo del valor de “p” asociado con cada término del modelo de AMOVA.

2.3.4.4. *Análisis de agrupamiento*

Las distancias de Dice fueron estimadas utilizando el coeficiente de similitud de Dice (Dice, 1945):

$$(DDI = 1-DSI)$$

dónde

$$DSI = 2a / (2a + b + c)$$

En el cual a = número de bandas compartidas entre los individuos “x” e “y”, b = número de bandas presentes en “x” y ausentes en “y”; c = número de bandas presentes en “y” y ausentes en “x”.

Las matrices de distancia obtenidas fueron sometidas a un análisis de agrupamiento utilizando el método de encadenamiento promedio UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2003), obteniéndose los dendrogramas correspondientes. Para cada dendrograma se indicó el coeficiente de correlación cofenética, el cual es una medida de la distorsión de datos que provoca el algoritmo para lograr el agrupamiento. Se realizaron tres análisis de conglomerados: considerando simultáneamente

los datos moleculares de SSR y SRAP para las distintas accesiones, y analizando por separado los datos SSR y SRAP para los 8 grupos taxonómicos mencionados previamente.

Además, a partir de la matriz de distancia de los datos de ambos marcadores moleculares, se generó un árbol usando el método de *Neighbor-joining* con el programa DARwin5 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006).

2.4. ANÁLISIS CONJUNTO DE LA INFORMACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

2.4.1. Análisis de Procrustes Generalizado

El análisis conjunto de los datos fenotípicos y los marcadores moleculares se realizó por medio de un Análisis de Procrustes Generalizado (APG) (Gower, 1975), mediante el programa estadístico Info-Gen (Balzarini y Di Renzo, 2003). Esta técnica multivariada de ordenación permitió combinar en un mismo espacio (espacio de consenso) la información brindada por los marcadores morfológicos y moleculares, y determinar el grado de concordancia entre la variabilidad genética detectada por cada uno de ellos.

El APG consensúa matrices de datos de diferente naturaleza para lograr una única configuración (Balzarini *et al.*, 2010). Dadas las diferencias en la naturaleza de las variables morfológicas y moleculares, previo a la realización del APG, fue necesaria la extracción de las coordenadas apropiadas para cada conjunto de datos: Componentes Principales (ACP) para las variables morfológicas cuantitativas y Coordenadas Principales (ACoorP) para las variables morfológicas cualitativas y para los datos moleculares.

Los cálculos que se realizaron durante el APG incluyeron: normalización, rotación, traslación y escalamiento de los datos. Estos se llevaron a cabo tratando que: 1) se mantengan las distancias entre los individuos de las configuraciones individuales, y 2) se minimice la suma de cuadrados entre puntos análogos (provenientes de distintas configuraciones pero para el mismo individuo) y su centroide. La configuración de consenso se obtuvo como la media de las configuraciones individuales apropiadamente transformadas (Balzarini *et al.*, 2010).

2.4.1. Análisis de Conglomerados

Con el conjunto total de los datos (morfológicos y moleculares), se calcularon los coeficientes de similitud de Gower (Gower, 1971) entre las accesiones de la colección de trabajo. Este coeficiente permite el tratamiento de diferentes tipos de variables (continuas y discretas) en forma simultánea (Materiales y Métodos, Sección 2.2.3.5.). Con la matriz resultante se generó un dendrograma utilizando distintos métodos, tales como Encadenamiento Completo, Promedio y Promedio Ponderado; a fin de obtener aquel que mejor clasificó mejor la colección de trabajo y presentó el mayor coeficiente de correlación cofenético.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FENOLÓGICA Y PRODUCTIVA

3.1.1. Caracteres cualitativos

Los fenotipos observados en cada accesión para los descriptores cualitativos registrados, no presentaron modificaciones en los distintos ambientes evaluados. Se muestran los fenotipos encontrados en la colección de *Pisum* para los caracteres: color de flor (Figura 1.1), borde de la hoja (Figura 1.2), forma de la estípula (Figura 1.3), color de la vaina (Figura 1.4), curvatura de la vaina (Figura 1.5) y forma de la parte distal de la vaina (Figura 1.6).

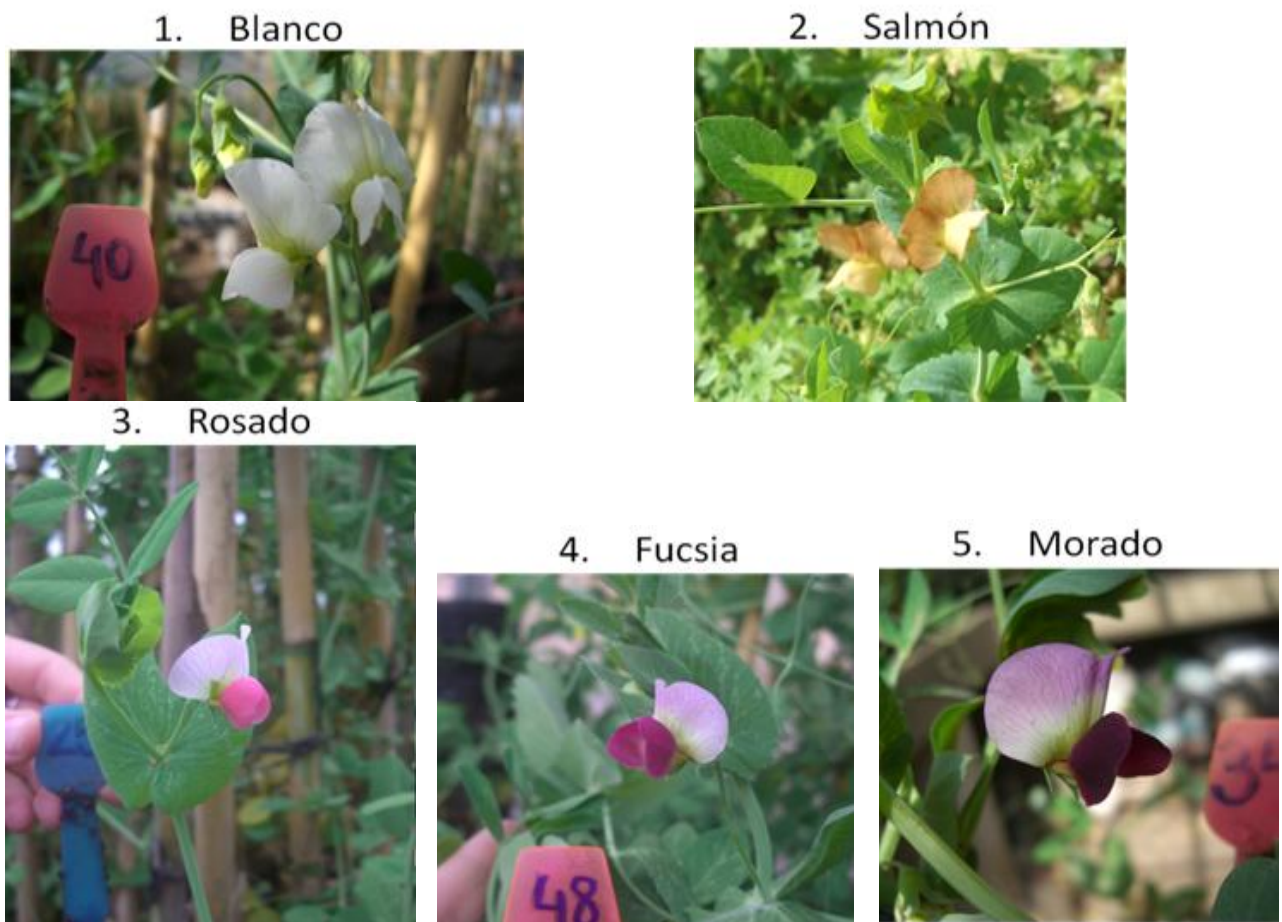


Figura 1.1. Fenotipos encontrados en la colección de *Pisum* para el carácter cualitativo color de flor (CF): blanco (1), salmón (2), rosado (3), fucsia (4), morado (5).

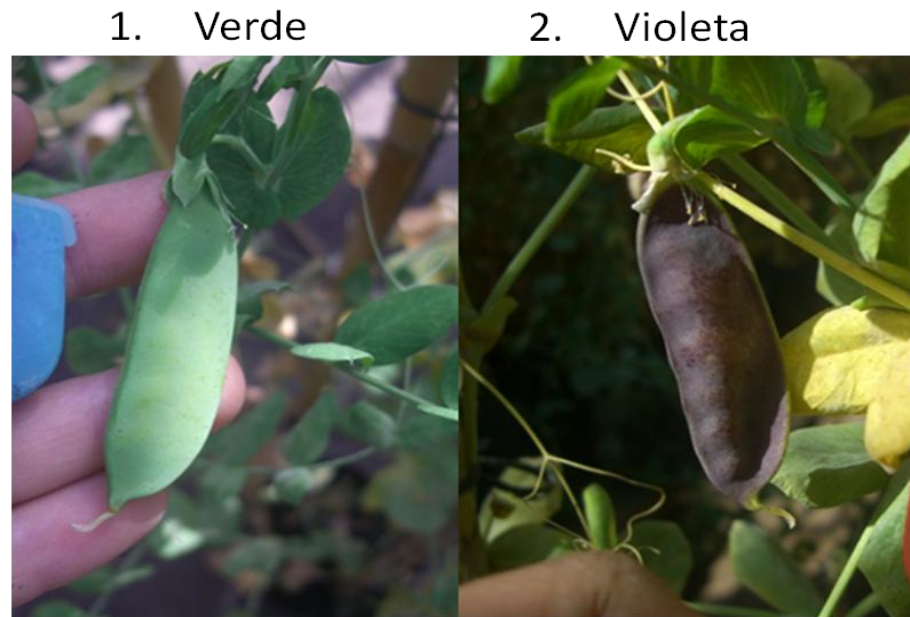


Figura 1.4. Fenotipos encontrados en la colección de *Pisum* para el carácter cualitativo color de la vaina (CV): verde (1) y violeta (2).

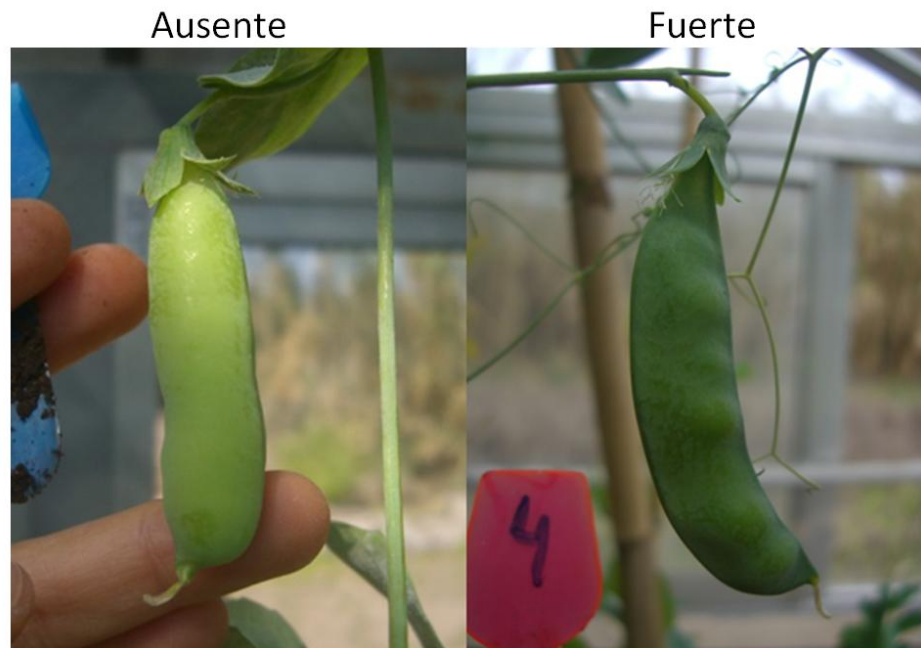


Figura 1.5. Dos de los fenotipos encontrados en la colección de *Pisum* para el carácter cualitativo curvatura de la vaina (curV): ausente y fuerte.

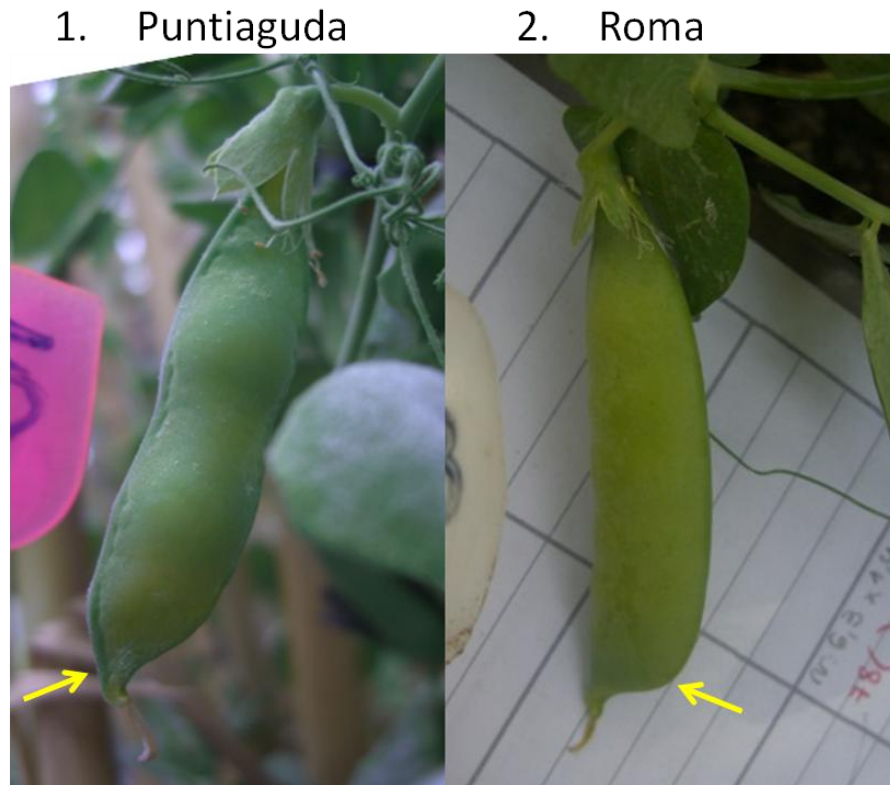


Figura 1.6. Fenotipos encontrados en la colección de *Pisum* para el carácter cualitativo forma de la parte distal de la vaina (disV): puntiaguda (1) y roma (2);

En la Figura 1.7 se puede observar la gran variación existente en los granos secos en cuanto al color y al tamaño (carácter cuantitativo) que se encontró en la colección de trabajo de *Pisum*. Así, para el carácter coloración de la cubierta del grano seco se definió la siguiente escala: blanco cremoso (1), verde claro (2), verde (3), verde azulado (4), verde amarronado (5), marrón (6), morado (7). Además, en cuanto a la coloración, hay granos que resultaron uniformes y otros no, presentando éstos últimos motas. Por último, con respecto al carácter superficie del grano seco, en dicha figura se pueden observar granos lisos y rugosos.



Figura 1.7: Granos secos de distintas accesiones de la colección activa de *Pisum*. Se observa la gran variación fenotípica de los mismos en cuanto al color (carácter cualitativo) y al tamaño (carácter cuantitativo).

Cabe aclarar que en la presente tesis se utilizó la clasificación taxonómica del género *Pisum* citada por Smýkal *et al.* (2011) y NCBI Taxonomy (2015) (Introducción, Tabla 1), para la presentación de los resultados.

En la Tabla 1.3. se muestran las frecuencias de los distintos fenotipos de cada descriptor cualitativo encontrados en la colección. Las accesiones de la especie *P. fulvum* fueron las que presentaron flores de color salmón. Además, se caracterizaron por tener folíolos con bordes ligeramente aserrados, estípulas no abrazadoras y granos lisos marrones. Las accesiones correspondientes al taxón *abyssinicum* (Introducción, Tabla 1) mostraron flores y granos color morado, y folíolos aserrados. Las dos taxa mencionadas (*P. fulvum* y *P. abyssinicum*), presentaron solo un par de folíolos. La única accesión que se distinguió por tener hojas con

siete pares de folíolos, que terminaban en su extremo con un folíolo más, en lugar de zarcillos, fue Acacia (cod 120). Las entradas King Tut-Purple Pod (cod 2) y NGB (cod 22) presentaron vainas de color violeta; pero, si bien sus vainas tuvieron curvatura ausente, la primera (cod 2) presentó vainas con extremo romo y, la segunda (cod 22), puntiagudo.

Tabla 1.3. Frecuencia relativa de cada carácter cualitativo en la colección de *Pisum*. CF: color de flor, BH: borde de la hoja, E: tipo de estípula, NPF: número de pares de folíolos en el PNF, CV: color de la vaina, curV: curvatura de la vaina, disV: forma de la parte distal de la vaina, SG: superficie del grano seco, CG1: coloración del grano seco, CG2: coloración del grano seco.

Carácter cualitativo	Clase	Frecuencia	Carácter cualitativo	Clase	Frecuencia
CF	1: blanco	0,70	curV	1: ausente	0,59
	2: salmón	0,02		2: media	0,27
	3: rosado	0,04		3: fuerte	0,14
	4: fucsia	0,10			
	5: morado	0,14			
BH	1: liso	0,94	disV	1: puntiaguda	0,24
	2: ligeramente aserrado	0,04		2: roma	0,76
	3: aserrado	0,02			
E	1: abrazadora	0,47	SG	1: lisa	0,77
	2: no abrazadora	0,53		2: lisa con agujeros	0,06
				3: rugosa	0,17
NPF	0: semiáfila	0,12	CG1	1: amarillo	0,26
	1: 1 par	0,06		2: verde claro	0,35
	2: 2 PF	0,40		3: verde	0,06
	3: 3 PF	0,38		4: verde azulado	0,02
	4: 4 PF	0,03		5: verde amarronado	0,20
	5: 7 PF	0,01		6: marrón	0,09
				7: morado	0,02
CV	1: verde	0,98	CG2	1: uniforme	0,85
	2: violeta	0,02		2: no uniforme	0,15

3.1.2. Caracteres cuantitativos

3.1.2.1. Evaluación de la variabilidad entre accesiones para los distintos caracteres en cada ambiente analizado

Los 16 caracteres cuantitativos presentaron una distribución normal, con valores del estadístico W cercanos a 1 ($W > 0,85$) (Anexo, Tabla 2).

El análisis de variancia mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las accesiones (genotipos) en los tres años para todos los caracteres cuantitativos evaluados (Tabla 1.4). La excepción fue el descriptor días a fin de cosecha (DC), para el cual no se observaron diferencias significativas entre genotipos en el año 2013. Además, se encontraron diferencias significativas entre las accesiones al 1% ($p < 0,01$), en lugar del 0,1% ($p < 0,001$), para las variables número de granos por parcela (NG) en el año 2012 y número de vainas por parcela (VP) en el 2013.

Tabla 1.4. Análisis de la Variancia a un criterio de clasificación para los distintos caracteres cuantitativos evaluados en los años 2011, 2012 y 2013. AP: altura de planta (cm), DF: días a 50% de floración de la parcela, DV: días a primera vaina, DC: días a fin de cosecha, PNF: primer nudo floral, NPV: nudo de la primera vaina, LH: longitud de la hoja (cm), AH: ancho de la hoja (cm), LE: longitud de la estípula (cm), AE: ancho de la estípula (cm), LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), VP: número de vainas por parcela, NG: número de granos por parcela, DG: diámetro de grano (mm), PG: peso de grano seco por parcela(g), GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios. F: Prueba F de Snedecor. Las variables LH, AH, LE y AE no fueron evaluadas en el año 2013.

Año 2011

		AP		DF		DV		DC	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	97	2171,29	10,62***	298,03	34,42***	236,60	18,62***	37,77	10,94***
Error	98	200,39		8,66		12,71		3,45	
		PNF		NPV		LH		AH	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	97	20,36	12,68***	19,68	12,08***	5,17	14,65***	1,67	15,02***
Error	98	1,61		1,63		0,35		0,11	

		LE		AE		LV		AV	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	97	2,43	3,48***	1,01	4,67***	2,49	17,75***	0,08	18,32***
Error	98	0,70		0,2		0,14		0,004	
		VP		NG		DG		PG	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	97	474123	2,39***	5906697	2,48***	0,02	18,27***	161727	3,51***
Error	98	198063		2377132		0,001		46137	

Año 2012

		AP		DF		DV		DC	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	125	2831,54	6,06***	387,99	4,37***	388,96	4,31***	368,86	2,31***
Error	126	467,25		88,78		90,25		159,68	
		PNF		NPV		LH		AH	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	125	27,69	7,44***	27,67	7,55***	3,88	11,65***	1,59	16,08***
Error	126	3,72		3,66		0,33		0,10	
		LE		AE		LV		AV	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	125	4,77	9,02***	2,31	10,17***	3,49	19,37***	0,09	9,04***
Error	126	0,53		0,23		0,18		0,01	
		VP		NG		DG		PG	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	125	787314	1,97***	8700692	1,74**	2,46	14,82***	107898	1,90***
Error	126	399652		5000398		0,17		56788	

Año 2013

		AP		DF		DV		DC	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	27	915,44	10,32***	200,49	21,51***	203,21	16,93***	23,39	1,35 ^{NS}
Error	28	88,71		9,32		12,00		17,33	
		PNF		NPV		LV		AV	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	27	29,5	23,03***	29,14	23,10***	4,25	27,00***	0,09	9,04***
Error	28	1,28		1,26		0,16		0,01	
		VP		NG		DG		PG	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Genotipo	27	38979	2,49**	302015	3,32***	2,53	44,62***	9818	3,16***
Error	28	15654		90968		0,06		3107	

NS: Diferencias no significativas

** : Diferencias significativas al 1% de probabilidad, $p < 0,01$

***: Diferencias significativas al 0,1% de probabilidad, $p < 0,001$

3.1.2.2. Evaluación del efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para las variables cuantitativas

Debido a que en el transcurso del desarrollo de la tesis se fueron incorporando accesiones a la colección de *Pisum*, el número de accesiones por año no fue constante. De este modo, se realizaron análisis de variancia a dos criterios de clasificación y considerando los dos ambientes (años) de evaluación para cada genotipo (accesión), a fin de determinar la influencia del ambiente (A) y de la interacción accesión x ambiente (GxA) en la expresión de los caracteres para cada genotipo.

Por un lado, en el conjunto de 98 materiales evaluados en los años 2011 y 2012, se detectó la existencia de diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) para las fuentes de variación GxA para las variables AP, DF, DV, DC, LV, VP y DG; mientras que el efecto de la

interacción GxA fue significativo al 1% para las variables NG y PG, y significativo al 5% para los descriptores PNF, NPV y AV (Tabla 1.5). Con respecto al efecto del ambiente (A), el mismo mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) para todas las variables, excluyendo LV que presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) y DF, DV, AV, DG y PG que no presentaron efecto significativo de A (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Análisis de la Variancia combinados para evaluar el efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para cada variable, considerando las 98 accesiones evaluadas en los años 2011 y 2012.

		AP		DF		DV		DC	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	195	2932,94	9,50***	364,55	7,11***	346,87	6,29***	250,64	2,80***
Genotipo (G)	97	4273,20	7,09***	589,03	4,65***	550,20	4,28***	289,12	1,46***
Ambiente (A)	1	91202,62	151,26***	16,80	0,33 ^{NS}	84,11	0,22 ^{NS}	1616,47	8,17***
GxA	97	602,96	1,95***	126,67	2,47***	128,47	2,33***	197,97	2,21***
Error	196	308,83		51,26		55,18		89,46	

		PNF		NPV		LV		AV	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	195	25,51	9,59***	25,13	9,43***	2,67	9,69***	0,080	10,29***
Genotipo (G)	97	45,76	11,47***	45,05	11,35***	4,71	9,61***	0,146	13,27***
Ambiente (A)	1	61,03	15,30***	62,43	15,73***	2,63	5,37**	0,017	2,16 ^{NS}
GxA	97	3,99	1,50*	3,97	1,49*	0,49	1,79***	0,011	1,45*
Error	196	2,66		2,67		0,28		0,008	

		VP		NG		DG		PG	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	195	872102,2	2,61***	783692,1	2,05***	2,33	16,37***	130175,7	2,39***
Genotipo (G)	97	907264,9	1,93***	9146700,1	15,41***	4,29	7,40***	174927,8	2,12***
Ambiente (A)	1	7036957,4	9,26***	4391450,6	11,48***	0,22	1,53 ^{NS}	1882,4	0,03 ^{NS}
GxA	97	760313,4	2,28***	593444,0	7,40**	0,28	1,93***	82652,0	1,52**
Error	196	334075,9		382546,8		0,14		54548,4	

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, $p < 0,001$.

Por otro lado, en el conjunto de 28 accesiones evaluados en los años 2012 y 2013, el efecto de la interacción GxA mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) sólo para AP y LV; y el efecto del ambiente fue altamente significativo ($p < 0,001$) para todas las variables evaluadas, exceptuando AV (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Análisis de la Variancia combinados para evaluar el efecto ambiente e interacción genotipo x ambiente para cada variable, considerando las 28 accesiones evaluadas en los años 2012 y 2013.

		AP		DF		DV		DC	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	55	2467,27	14,94***	215,08	7,27***	226,13	8,38***	251,14	5,08***
Genotipo	27	3046,20	6,59***	332,44	11,24***	352,24	13,05***	100,88	2,14**
Ambiente	1	39209,62	84,78***	914,18	30,92***	1217,97	45,13***	9488,94	192,03***
GxA	27	462,50	2,80***	47,98	1,62 ^{NS}	39,60	1,47 ^{NS}	43,26	0,88 ^{NS}
Error	56	165,12		29,56		26,99		49,42	

		PNF		NPV		LV		AV	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	55	25,20	10,21***	25,08	10,61***	4,68	30,44***	0,102	28,98***
Genotipo (G)	27	44,60	18,10***	44,63	18,88***	8,52	18,13***	0,195	55,15***
Ambiente (A)	1	48,80	19,77***	44,20	18,70***	3,35	21,81***	0,001	0,23 ^{NS}
GxA	27	2,95	1,19 ^{NS}	3,18	1,34 ^{NS}	0,47	3,07***	0,005	1,36 ^{NS}
Error	56	2,47		2,36		0,15		0,004	

		VP		NG		DG		PG	
Fuente	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Modelo	55	263082,7	2,98***	3511407	3,01***	2,81	25,91***	64781,9	3,04***
Genotipo	27	189630,9	2,14**	2426446	2,08**	5,04	46,47***	50146,3	2,35***
Ambiente	1	6003627,3	67,90***	85964868	73,67***	2,36	21,74***	1515471,7	71,07***
GxA	27	110260,8	1,25 ^{NS}	1500177	1,29 ^{NS}	0,14	1,28 ^{NS}	26245,3	1,23 ^{NS}
Error	56	88418,4		1166859		0,11		21324,8	

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, $p < 0,001$

Cabe aclarar que, las variables cuantitativas: LH, AH, LE y AE, se excluyeron del análisis del efecto del A y de la interacción GxA; puesto que las mismas fueron evaluadas un solo año en cada accesión de la colección de *Pisum*.

A fin de despejar los efectos genotípicos se calcularon los valores ajustados, los cuales fueron utilizados para el resto de los análisis estadísticos.

Los valores promedios ajustados junto al rango, el valor promedio general y el coeficiente de variación fueron calculados para cada variable cuantitativa (Anexo, Tabla 3). Se observó un amplio rango para todas las variables analizadas, siendo los caracteres productivos VP, NG y PG los que presentaron mayor rango. Estos caracteres productivos también mostraron los valores de coeficientes de variación más altos; mientras que, los caracteres fenológicos (DF, DV, DC) y las variables LV, AV y DG presentaron los coeficientes de variación más bajos.

3.1.2.3. Condiciones climáticas en los distintos años evaluados

Los datos meteorológicos registrados en la base de datos de INTA - Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico (SIGA) entre las fechas de siembra y fin de cosecha de *Pisum*, indicaron que en el año 2012 las precipitaciones totales en el norte de la provincia de

Buenos Aires fueron de 621,0 mm; mientras que, en los años 2011 y 2013 fueron de 333,8 mm y 355,0 mm, respectivamente (Tabla 1.7).

Los registros pluviométricos de los meses de Agosto, Septiembre y Octubre del 2012, para el departamento de Rosario, entre otros del sur de Santa Fe, señalaron que en esos tres meses se produjeron lluvias que triplicaron los registros promedios para dichos meses (Andriani, 2012). Los valores promedios fueron calculados considerando los meses de Agosto, Septiembre y Octubre para los 57 años anteriores al 2012.

Tabla 1.7. Datos meteorológicos de precipitación como día pluviométrico, temperatura máxima promedio del aire y temperatura mínima promedio del aire, registrados durante el período comprendido entre el mes de Junio y Noviembre inclusive para los años 2011, 2012 y 2013 (<http://siga2.inta.gov.ar>).

	2011	2012	2013
Precipitación (mm)	333,8	621,0	355,0
Temperatura Máxima (°C)	19,9	20,1	20,3
Temperatura Mínima (°C)	8,6	9,7	8,4

Con respecto a la temperatura, la temperatura mínima promedio registrada en el año 2012 durante el período Junio-Noviembre fue de 9,7°C, valor que supera en más de un grado centígrado a las temperaturas mínimas promedios de los años 2011 y 2013, las cuales fueron 8,6°C y 8,4°C, respectivamente (Tabla 1.7). La temperatura máxima promedio fue semejante para los tres años en el lapso considerado.

3.1.2.4. Análisis de Componentes Principales

Considerando la proporción acumulada de la variancia total, se observó que las tres primeras componentes explican más del 70% de la variación total (Tabla 1.8).

La primera componente principal contribuyó con el 35,9% de la variación total explicada. Considerando los valores de los autovectores (Tabla 1.9), días a 50% de floración de la parcela, días a primera vaina, primer nudo floral, nudo de la primera vaina y número de vainas y de granos por parcela fueron las variables que más contribuyeron en forma positiva. En cambio, las variables ancho de vaina, longitud de vaina y diámetro de vaina fueron los caracteres que más

contribuyeron en forma negativa. Así, la primera componente permite distinguir las accesiones que florecen y forman vaina en forma temprana, con valores de PNF y NPV pequeños, y que presentan vainas y granos grandes.

La segunda componente principal contribuyó con el 22,9% de la variación total explicada. Los caracteres que más contribuyeron en forma positiva fueron los relacionados al tamaño de la hoja: longitud y diámetro de folíolos y estípulas. Con esta componente es posible distinguir las accesiones de *Pisum* que tienen estípulas y folíolos grandes. Las variables altura de planta y peso de granos también contribuyeron en forma positiva.

La tercera componente principal contribuyó con más del 11,5% de la variación total explicada. Los descriptores longitud y diámetro de folíolos fueron los que más contribuyeron en forma negativa; y los descriptores peso de grano seco por parcela, longitud de vaina y días a fin de cosecha en forma positiva. Este componente permite distinguir las accesiones con alto rendimiento, que son cosechadas tempranamente, y que presentan grandes vainas y folíolos pequeños.

Así, en la Tabla 1.8 se puede observar las variables que más contribuyeron en cada una de las tres primeras componentes principales.

Tabla 1.8. Autovalores, porcentaje de variancia que explica cada uno y porcentaje de variancia total acumulada para las variables cuantitativas.

N°	Autovalor (λ)	Variancia	Variancia acumulada
1	5,738	0,359	0,359
2	3,661	0,229	0,587
3	1,834	0,115	0,702
4	1,636	0,102	0,804
5	1,026	0,064	0,869
6	0,785	0,049	0,918
7	0,489	0,031	0,948

Tabla 1.9. Valores de los autovectores para las variables cuantitativas en las tres primeras componentes principales (CP). Valores en color azul corresponden a los descriptores que más contribuyen en cada componente.

	CP1	CP2	CP3
DF	0,347	0,098	0,030
DV	0,350	0,092	0,044
PNF	0,314	0,049	-0,104
NPV	0,318	0,046	-0,103
DC	0,233	0,213	0,325
AP	0,211	0,236	0,159
LV	-0,274	0,235	0,342
AV	-0,290	0,237	0,275
DG	-0,285	0,233	0,262
VP	0,314	0,170	0,052
NG	0,288	0,195	0,145
PG	0,060	0,270	0,410
LH	-0,035	0,365	-0,381
AH	-0,109	0,360	-0,364
LE	-0,043	0,395	-0,241
AE	-0,1346	0,390	-0,238

En la Figura 1.8 se observa la distribución de las accesiones de la colección de *Pisum*. Las accesiones de *P. sativum* subespecies: *transcaucasicum*, *elatius*, *jomardii* y *sativum* var. *arvense*, se ubicaron en dicho gráfico, en general, a valores altos y positivos de la CP1. Estas accesiones son tardías y presentan un gran número de nudos desde la base de la planta hasta la aparición del primer nudo reproductivo y de la primera vaina. Además, tienen un gran número de vainas y granos, pero de pequeño tamaño. En cambio, en general, las accesiones de la subespecie *sativum* var. *sativum* y var. *macrocarpon*, se ubicaron en el gráfico a valores cercanos a cero o negativos de CP1. Estas variedades botánicas son más precoces y con menor PNF y NPV, y presentan vainas y grano de mayor tamaño. Por otro lado, las accesiones de *P. fulvum* (cod 109 y 110) y *P. abyssinicum* (cod 41 y 42) presentan folíolos y estípulas de pequeño tamaño en comparación a la mayoría de las accesiones de la colección; ya que se encontraron a valores bajos de CP2.

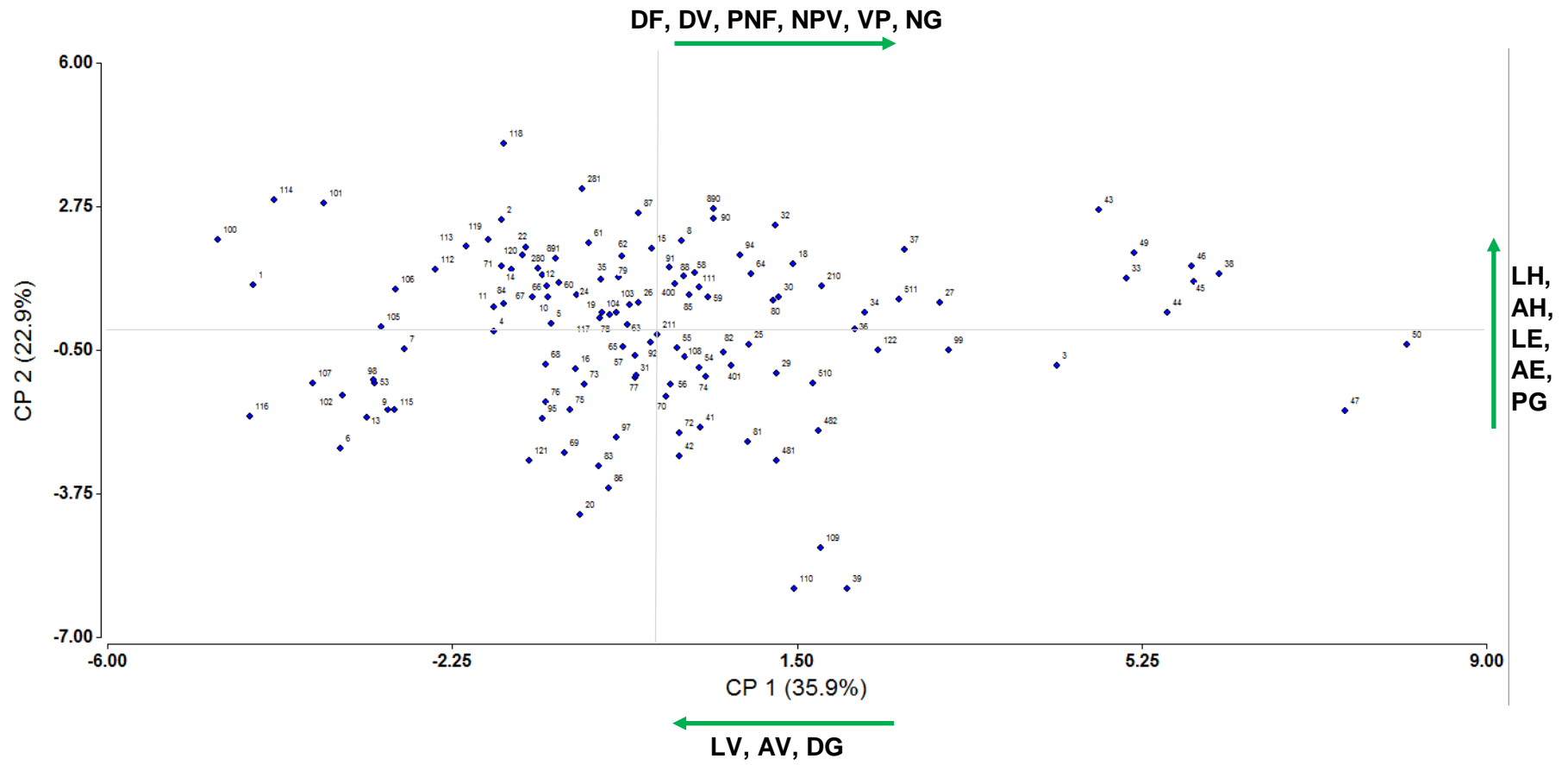


Figura 1.8. Gráfico biplot obtenido a partir del Análisis de Componentes Principales de la colección de *Pisum*, considerando los 16 descriptores cuantitativos.

En la matriz de correlación fenotípica (Anexo, Tabla 4), se observó que DF y DV están altamente correlacionadas en forma positiva ($r=0,99$), por lo cual brindan la misma información y convendría evaluar una sola de las dos variables en futuros ensayos a campo. Lo mismo sucede con los descriptores PNF y NPV ($r=0,99$). Los caracteres cuantitativos que presentaron una correlación alta en forma positiva fueron: LH y AH ($r=0,94$), NV y NG ($r=0,93$), LV y AV ($r=0,89$), LE y AE ($r=0,88$), AV y DG ($r=0,88$), LV y DG ($r=0,83$), DF y DC ($r=0,71$) y DV y DC ($r=0,72$).

3.1.3. Análisis de conglomerados

El análisis de agrupamiento de las accesiones de la colección de *Pisum* utilizando los caracteres cuantitativos y cualitativos, permitió distinguir dos grupos principales (Figura 1.9): el primer grupo (G1), constituido por *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum* subespecies *transcausicum*, *elatius*, *jomardii* y *sativum* var. *arvense*; y el segundo grupo (G2), formado en general, por *P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum* y var. *macrocarpon*. El G1 quedó conformado por accesiones significativamente menos precoces, de mayor altura de planta y de menor tamaño de estípula, comparadas con aquellas de G2. Además, G1 presentó gran número de vainas y granos por parcela, pero de menor tamaño y peso comparado con las vainas y granos de G2 (Tabla 1.10). Entre los dos grupos no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) para el descriptor DC. Lo mismo sucedió con los caracteres LH y AH; aunque claramente el G2 presentaba folíolos de mayor tamaño. Esto probablemente se debe a que en G2 se encuentran quince cultivares semiáfilos, lo cual disminuye considerablemente los valores promedios de LH y AH. El G2 presentó, en general, flores de color blancas; en cambio, el G1 tuvo flores coloreadas (Tabla 1.11). Los granos de G1 fueron de superficie lisa, de coloración intensa (verde-amarronados, marrón, morados) y muchos presentaron una coloración no uniforme. Por el contrario, los granos de G2 fueron lisos o rugosos, de coloración uniforme y en general, amarillos o verdes (Tabla 1.11).

El dendrograma mostró que en el G1, *P. fulvum* y *P. abyssinicum* (G1A) se separaron de las subespecies de *P. sativum* (G1B). Estos dos subgrupos (G1A y G1B), mostraron diferencias significativas en todos los caracteres cuantitativos, con excepción al tamaño de la vaina (LV y AV) (Tabla 1.12). En el G1A se encontraron accesiones con bordes de hojas aserrados y con

menor número de pares de folíolos en relación a G1B. En G1B las vainas presentaron una curvatura más pronunciada comparada con las vainas de G1A.

Dentro del G2, la accesión NGB (cod 22) (G2A), quedó claramente separada del resto de los cultivares (G2B y G2C). Esta accesión presentó vainas de color violeta, flores coloreadas, granos lisos y marrones y estípulas no abrazadoras. En el subgrupo G2C se encontraron los cultivares Suttons Early Giant (cod 100), Duke of Albany (cod 101) y Telephone Gold. Straw. (cod 114), los cuales se destacaron por presentar vainas y granos de muy gran tamaño y folíolos y estípulas grandes. Estos tres cultivares se ubicaron en el extremo superior izquierdo del gráfico obtenido con el Análisis de Componentes Principales (Figura 1.8). En G2C las vainas fueron verdes con la parte distal puntiaguda, las flores blancas, los granos rugosos y las estípulas abrazadoras.

El dendrograma obtenido presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,801, lo que indica la existencia de una elevada correlación entre las interdistancias de este gráfico y las interdistancias en la matriz de distancia sobre la que se aplicó el procedimiento.

Considerando la matriz de distancias de Gower (Anexo, Tabla 5), el valor de distancia máxima se encontró entre la accesión Melrose Winter (cod 50) de *P. sativum* ssp. *sativum* var. *arvense* y los cultivares Suttons Early Giant (cod 100) y Telephone Gold. Straw. (cod 114). En ambos casos este valor fue 0,77. La distancia mínima se observó entre los cultivares Cuarentinas (cod 15) y ZAV17 (cod 91), y Amarilla (cod 77) y ZAV1 (cod 56); el cual fue 0,16.

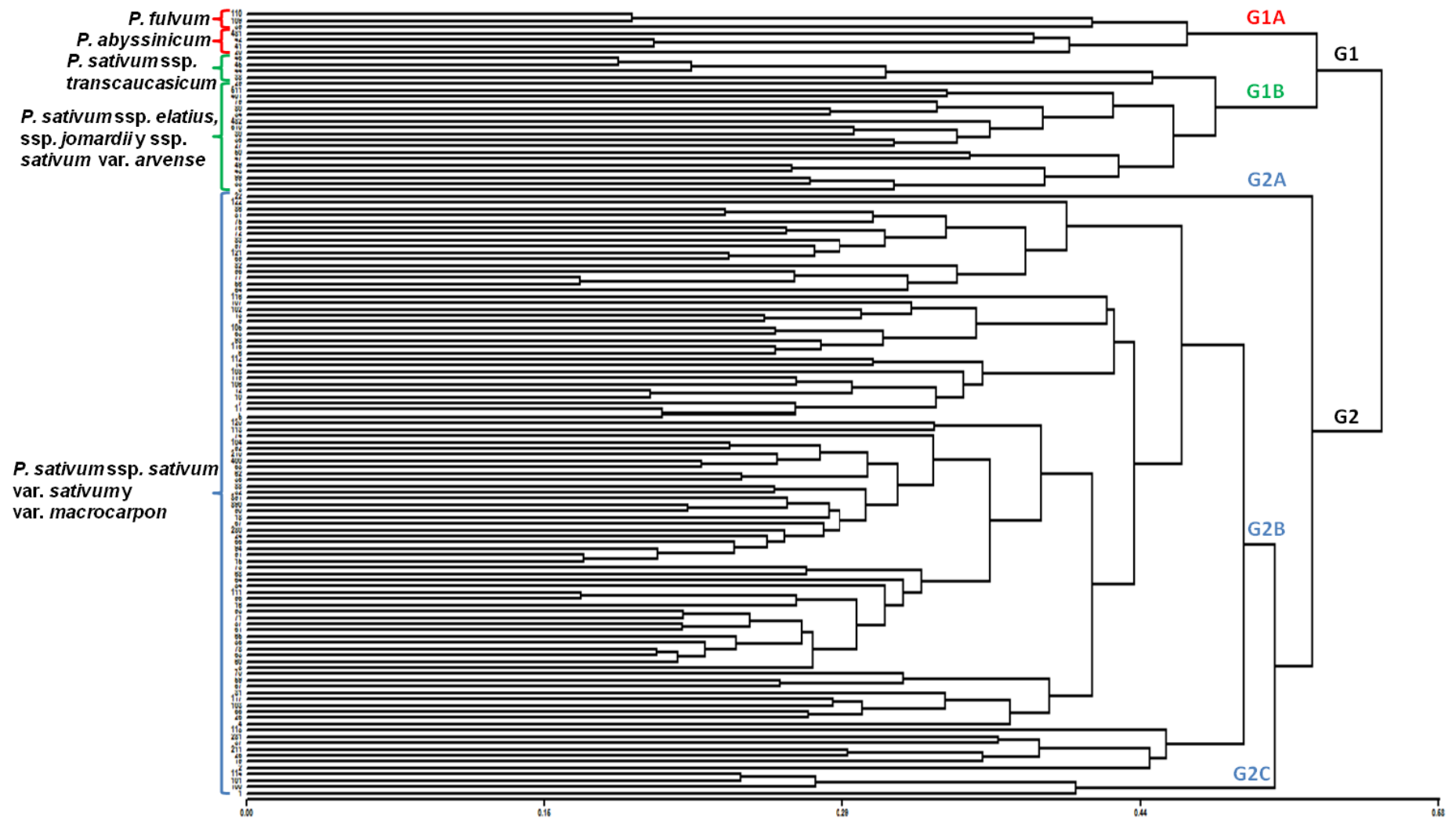


Figura 1.9. Dendrograma del Análisis de Conglomerados de las accesiones de *Pisum* construido a partir de los descriptores cuantitativos y cualitativos.

Tabla 1.10. Valores promedios \pm EE de las variables cuantitativas para cada uno de los dos grupos principales conformados por el análisis de conglomerados. G1: grupo 1, G2: grupo2. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$).

Carácter cuantitativo	G1	G2
AP	126,0 ^a \pm 7,3	97,8 ^b \pm 4,2
DF	107,0 ^a \pm 3,8	89,7 ^b \pm 1,1
DV	112,0 ^a \pm 3,8	94,6 ^b \pm 1,1
DC	161,3 ^a \pm 3,7	152,9 ^b \pm 1,4
PNF	17,4 ^a \pm 1,1	12,5 ^b \pm 0,3
NPV	17,6 ^a \pm 1,1	12,6 ^b \pm 0,3
LH	3,80 ^a \pm 0,21	3,91 ^a \pm 0,19
AH	1,97 ^a \pm 0,10	2,28 ^a \pm 0,12
LE	5,83 ^a \pm 0,30	6,66 ^b \pm 0,11
AE	2,99 ^a \pm 0,14	3,81 ^b \pm 0,08
LV	5,24 ^a \pm 0,27	7,35 ^b \pm 0,08
AV	0,97 ^a \pm 0,04	1,29 ^b \pm 0,02
VP	1600 ^a \pm 184	850 ^b \pm 46
NG	5001 ^a \pm 474	3110 ^b \pm 175
DG	5,08 ^a \pm 0,18	7,05 ^b \pm 0,08
PG	335,4 ^a \pm 32,4	455,6 ^b \pm 23,1

Tabla 1.11. Frecuencias absolutas de los caracteres cualitativos en cada uno de los dos grupos principales conformados por el análisis de conglomerados. CF: color de flor, BH: borde de la hoja, E: tipo de estípula, NPF: número de pares de folíolos en el PNF, CV: color de la vaina, curV: curvatura de la vaina, disV: forma de la parte distal de la vaina, SG: superficie del grano seco, CG1: coloración del tegumento del grano seco, CG2: coloración del tegumento del grano seco.

Carácter cualitativo	Clase	Frecuencia absoluta		Carácter cualitativo	Clase	Frecuencia absoluta	
		G1	G2			G1	G2
CF	1: blanco	0	88	curV	1: ausente	13	61
	2: salmón	2	0		2: media	7	27
	3: rosado	3	2		3: fuerte	9	9
	4: fucsia	9	4				
	5: morado	15	3				
BH	1: liso	22	96	disV	1: puntiaguda	3	27
	2: ligeramente aserrado	4	1		2: roma	26	70
	3: aserrado	3	0				
E	1: abrazadora	4	55	SG	1: lisa	29	68
	2: no abrazadora	25	42		2: lisa con agujeros	0	7
					3: rugosa	0	22
NPF	0: semiáfila	0	15	CG1	1: amarillo	0	33
	1: 1 par	4	3		2: verde claro	0	44
	2: 2 PF	10	46		3: verde	0	8
	3: 3 PF	12	32		4: verde azulado	0	3
	4: 4 PF	3	0		5: verde amarronado	19	6
	5: 7 PF	0	1		6: marrón	8	3
CV	1: verde	29	95	CG2	1: uniforme	10	96
	2: violeta	0	2		2: no uniforme	19	1

Tabla 1.12. Valores promedios de las variables cuantitativas para los subgrupos constituidos por el análisis de conglomerados. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$).

Carácter	G1A	G1B	Carácter	G2A	G2B	G2C
AP	77,6 ^a	141,4 ^b	AP	82,0 ^a	97,1 ^a	117,0 ^a
DF	91,4 ^a	112,0 ^b	DF	103,0 ^a	90,3 ^{a,b}	73,5 ^b
DV	96,3 ^a	117,0 ^b	DV	108,0 ^a	95,1 ^{a,b}	78,9 ^b
DC	139,6 ^a	168,2 ^b	DC	167,0 ^a	153,5 ^{a,b}	134,9 ^b
PNF	13,1 ^a	18,8 ^b	PNF	12,5 ^a	12,6 ^a	11,4 ^a
NPV	13,3 ^a	18,9 ^b	NPV	12,5 ^a	12,7 ^a	11,5 ^a
LH	2,60 ^a	4,19 ^b	LH	5,10 ^a	3,82 ^a	5,58 ^a
AH	1,44 ^a	2,14 ^b	AH	3,50 ^a	2,21 ^b	3,66 ^a
LE	4,04 ^a	6,40 ^b	LE	7,48 ^{a,b}	6,60 ^a	7,93 ^b
AE	2,16 ^a	3,25 ^b	AE	4,75 ^a	3,74 ^b	5,22 ^a
LV	4,36 ^a	5,52 ^a	LV	7,38 ^a	7,27 ^a	9,04 ^b
AV	0,87 ^a	1,00 ^a	AV	1,45 ^{a,b}	1,27 ^a	1,65 ^b
VP	559 ^a	1932 ^b	VP	600 ^{a,b}	879 ^a	268 ^b
NG	2375 ^a	5836 ^b	NG	1730 ^a	3217 ^a	1042 ^a
DG	4,44 ^a	5,29 ^b	DG	8,50 ^a	6,95 ^b	8,87 ^a
PG	141,0 ^a	397,3 ^b	PG	200,0 ^a	467,9 ^a	238,7 ^a

3.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

3.2.1. Medidas de Variabilidad Genética

3.2.1.1. Marcadores tipo SSR

El análisis de los marcadores SSR mostró un total de 126 alelos con un mínimo de cinco alelos, y un máximo de once alelos por locus (Tabla 1.13). Las 126 bandas fueron polimórficas. El número efectivo de alelos por locus (A_e) varió de 5,000 a 9,941, con una media de 6,699. Los valores de PIC calculados fueron altos, variando de 0,712 a 0,891, con un promedio de 0,824. Los valores de Diversidad Genética (H) fueron elevados, variando de 0,750 a 0,899, con un valor de 0,842 como promedio.

Tabla 1.13. Grupo de ligamiento y medidas de diversidad genética para los 15 SSR analizados. A: número de alelos por locus; A_e : número efectivo de alelos por locus; PIC: Contenido de Información Polimórfica; H: Diversidad Genética.

SSR	Grupo de ligamiento	A	A_e	PIC	H
A9	IV	6	5,000	0,772	0,800
AA92	IV	7	6,400	0,825	0,844
AA135	VII	7	6,400	0,825	0,844
AA153	II	6	6,000	0,810	0,833
AA160	VII	5	4,000	0,712	0,750
AA205	II	11	9,143	0,881	0,891
AB23	V	8	7,364	0,849	0,864
AC58	V	11	9,941	0,891	0,899
AC74	VI	6	6,000	0,810	0,833
AD56	VII	10	7,682	0,856	0,870
AD59	VI	8	5,261	0,792	0,810
AD61	IV	11	7,692	0,858	0,870
AD147	I	10	8,167	0,866	0,878
AD148	II	11	5,226	0,795	0,809
D21	I	9	6,205	0,819	0,839
Media		8,4	6,699	0,824	0,842

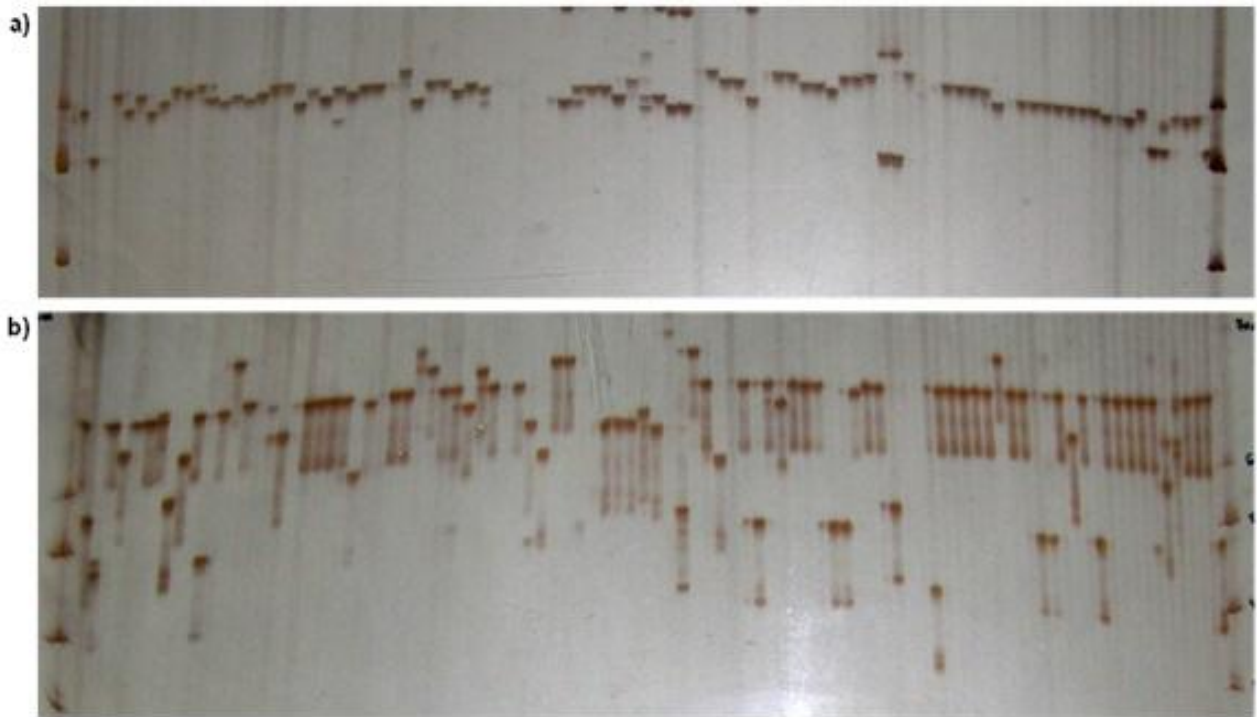


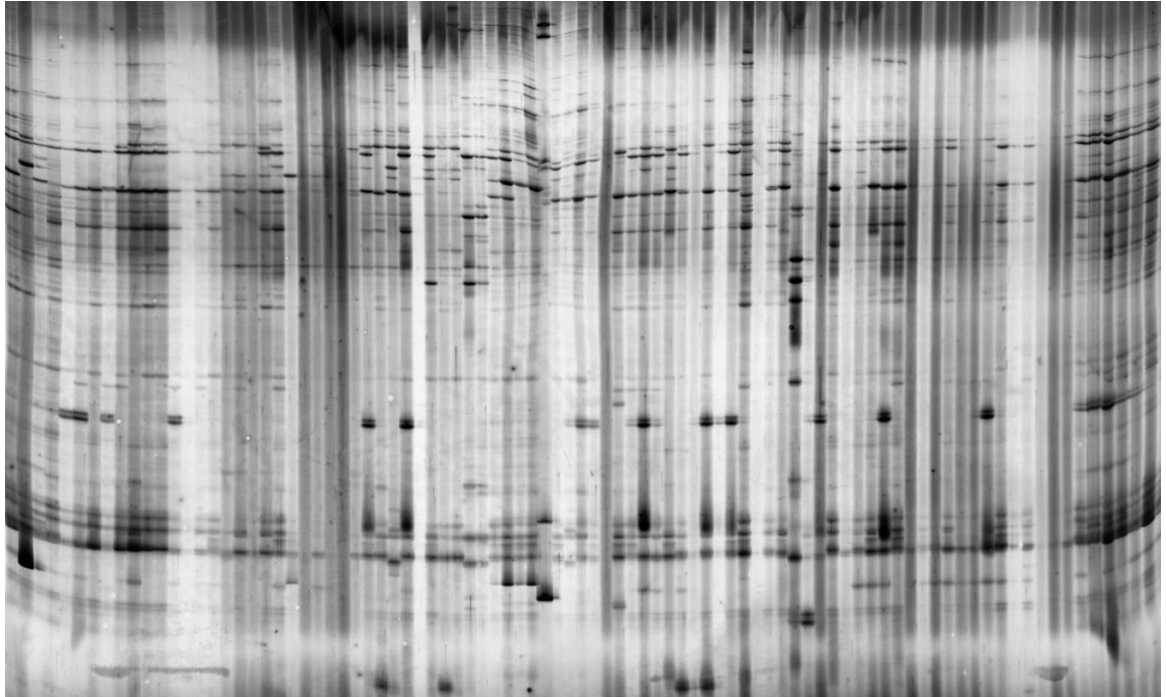
Fig. 1.10. Geles de poliacrilamida 6% con los productos de PCR de las accesiones de *Pisum* para dos marcadores SSR: **a)** AA205 y **b)** D21. Marcador de Peso Molecular: en la primer y última calle de los geles.

3.2.1.2. Marcadores tipo SRAP

Las 10 combinaciones de SRAP generaron un total de 374 bandas, de las cuales 361 fueron polimórficas. Así, se encontró un alto nivel de polimorfismo, el cual fue de 96,52%. El número de bandas por combinación de cebadores varió de 24 a 62, con un promedio de 37,4 (Tabla 1.14). Los valores calculados de PIC variaron entre 0,329 y 0,371, con un promedio de 0,347.

Tabla 1.14. Número de bandas y valores de PIC para las 10 combinaciones de SRAP utilizadas.

Combinaciones de SRAP	Número de bandas	PIC
me1-em2	35	0,366
me2-em1	32	0,371
me2-em3	24	0,346
me2-em4	41	0,345
me3-em2	62	0,329
me3-em3	37	0,332
me4-em2	36	0,336
me4-em4	35	0,352
me5-em3	26	0,332
me5-em4	46	0,355
Media	37,4	0,347

**Fig. 1.11.** Fragmento de geles de poliacrilamida 6% con el patrón de bandeo de SRAP de 88 accesiones de *Pisum* para la combinación de cebadores me4-em4.

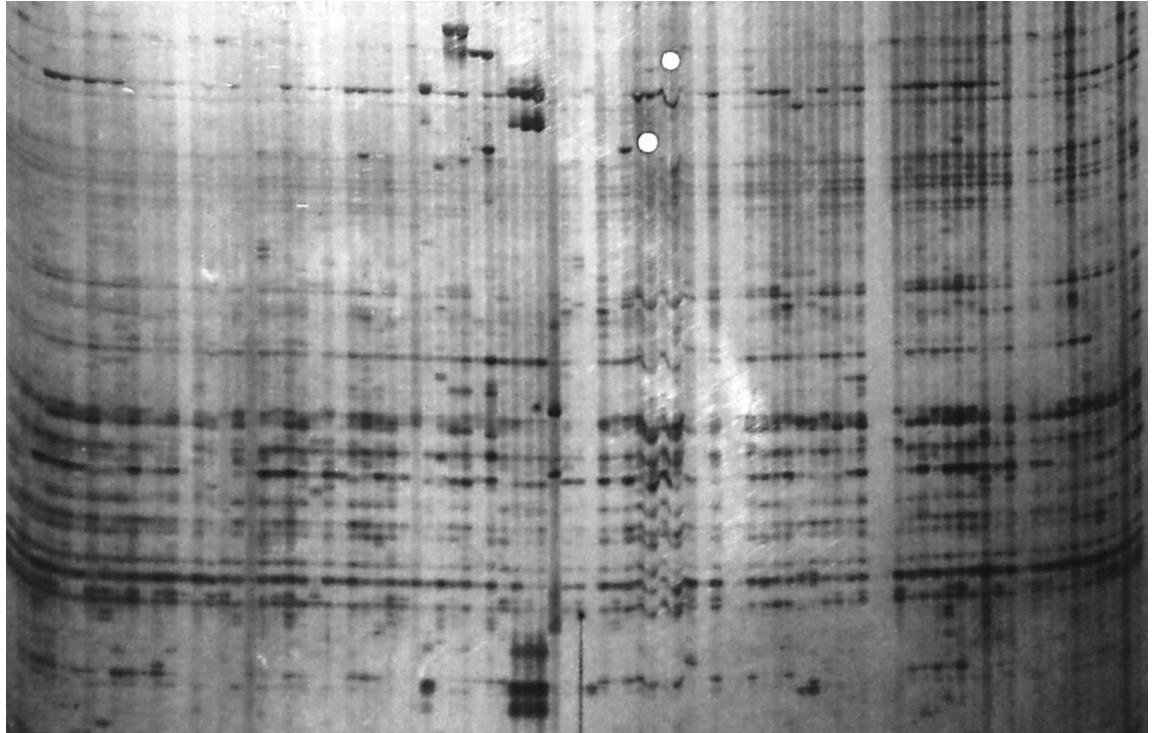


Fig. 1.12. Fragmento de geles de poliacrilamida 6% con el patrón de bandeo de SRAP de 88 accesiones de *Pisum* para la combinación de cebadores me5-em4.

3.2.2. Correlación entre SSR y SRAP

El test de Mantel reveló una correlación positiva y significativa ($r=0,26$, $p<0,001$) entre las matrices lineales de distancias genéticas individuales de SSR y SRAP. Sin embargo, esta correlación resultó significativa por el número de datos utilizados; pero no tiene sentido estadístico. En el gráfico entre los elementos correspondientes de estas dos matrices (Figura 1.13 a), se observó que la correlación positiva es espúrea dado los bajos valores de R^2 ($R^2=0,065$). Esto sugiere que, a nivel individual, la correlación entre SSR y SRAP fue muy débil para los marcadores SSR y SRAP usados en este estudio.

La correlación entre las distancias grupales entre SSR y SRAP fue mucho más alta ($r=0,78$, $p<0,001$, figura 1.13 b). Esto sugiere que ambos tipos de marcadores moleculares dieron estimaciones similares de las relaciones genéticas a nivel de los grupos taxonómicos

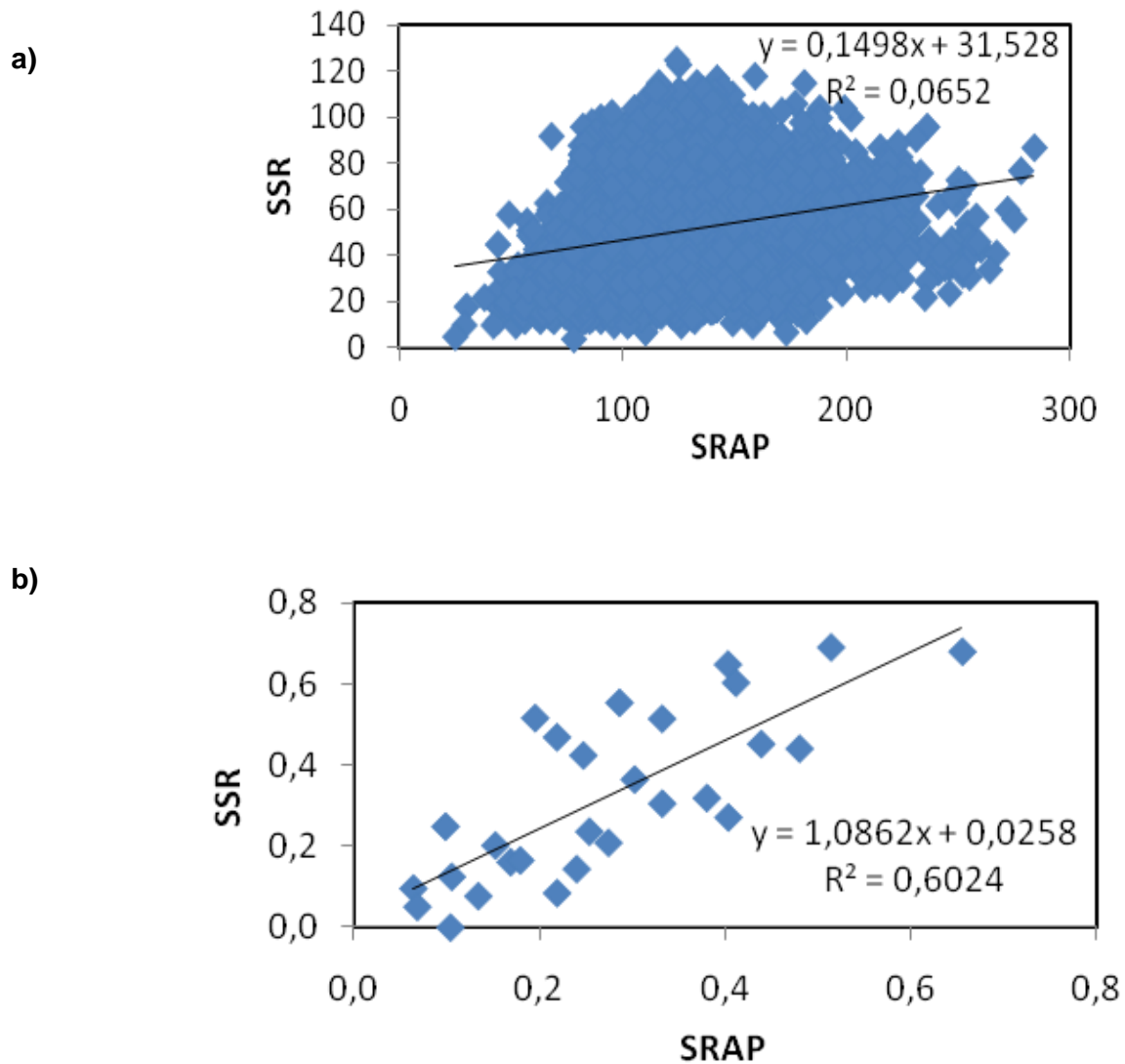


Figura 1.13: Comparación de las distancias genéticas individuales entre SSR y SRAP (a). Comparación de las distancias genéticas entre SSR y SRAP considerando los 8 grupos taxonómicos (b).

3.2.3. Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)

Los AMOVA tanto para los datos moleculares de SSR como de SRAP (Tabla 1.15), sugirieron que existe variabilidad genética o que al menos uno de los 8 grupos taxonómicos considerados se diferencia de los otros respecto a sus perfiles moleculares promedio

($p < 0,0001$). Además, dentro de cada uno de los grupos también existe variabilidad genética ($p < 0,0001$). Los valores de los coeficientes de correlación ϕ_{PT} ($\phi_{PT(SSR)} = 0,22$ y $\phi_{PT(SRAP)} = 0,23$) fueron estadísticamente significativos, sugiriendo que a pesar de la variabilidad observada dentro de los grupos, el “factor” grupos taxonómicos produjo una estructuración genética.

Tabla 1.15. Resultados del AMOVA para SSR y SRAP, mostrando los porcentajes de variación entre los grupos taxonómicos y dentro de los grupos, y la estimación del coeficiente de correlación ϕ_{PT} .

SSR	GL	SC	CM	p-valor	Comp.Var.	Porcentaje
Entre grupos	7	26681,11	3811,59	<0,0001	372,11	21,99
Dentro grupos	112	147866,64	1320,24	<0,0001	1320,24	78,01
Total	119	174547,75	1466,79		1692,35	100,00

Coeficiente	Estimación	Valor p
ϕ_{PT}	0,22	<0,0001

SRAP	GL	SC	CM	p-valor	Comp.Var.	Porcentaje
Entre grupos	7	168765,77	24109,40	<0,0001	2231,75	23,11
Dentro grupos	112	831537,18	7424,44	<0,0001	7424,44	76,89
Total	119	1000302,95	8405,91		9656,19	100,00

Coeficiente	Estimación	Valor p
ϕ_{PT}	0,23	<0,0001

3.2.4. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento de las accesiones de la colección de trabajo utilizando el método UPGMA y los datos de marcadores SSR y SRAP, definió tres grupos principales (Figura 1.14): *P. fulvum* (grupo 1), *P. abyssinicum* (grupo 2) y *P. sativum* (grupo 3). La especie silvestre, *P. fulvum*, se apartó a una distancia de 0,77 de las otras dos especies. El dendrograma resultante presentó un elevado coeficiente de correlación cofenética de 0,923.

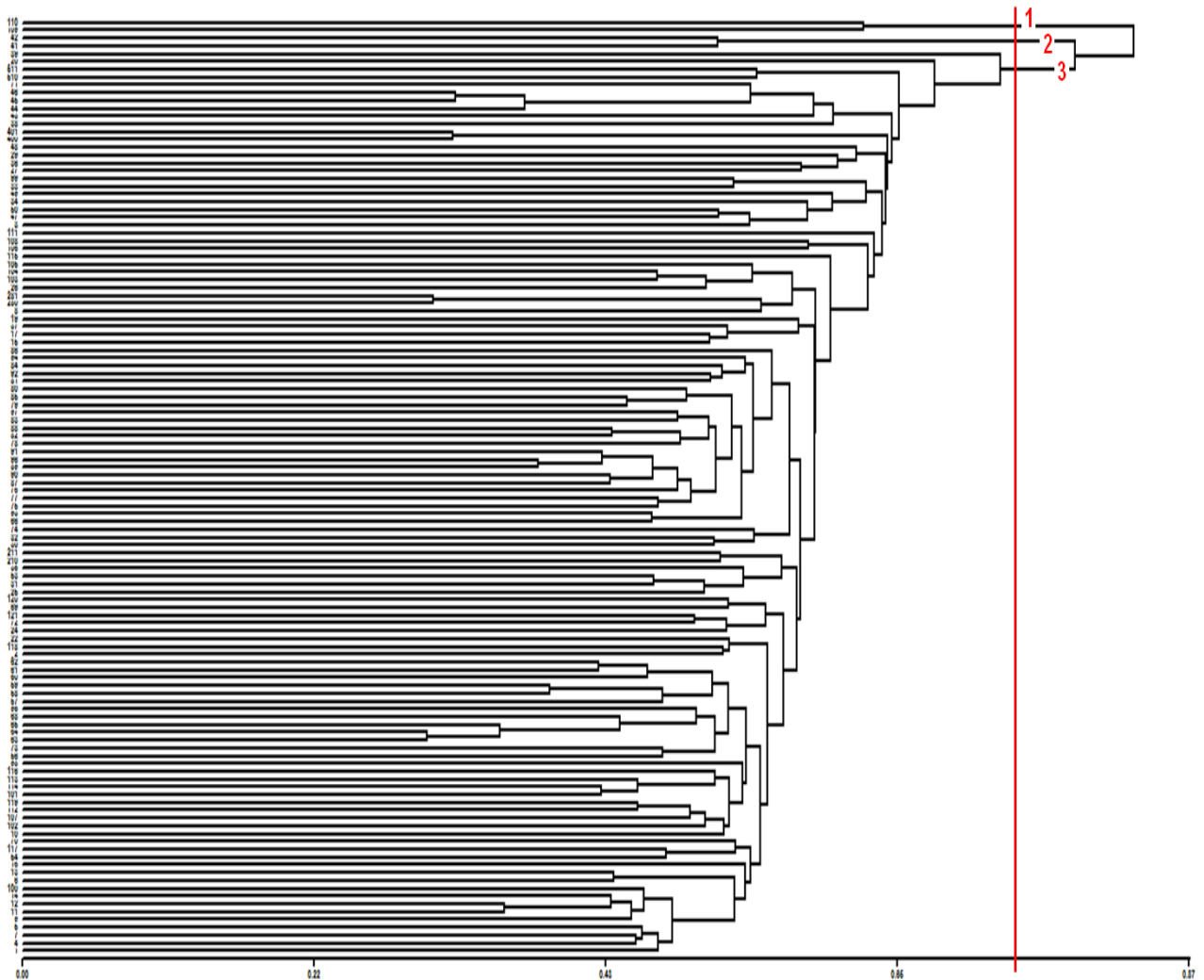


Figura 1.14. Dendrograma obtenido a partir de los marcadores moleculares SSR y SRAP ilustrando las relaciones genéticas entre las accesiones de la colección de *Pisum*.

En el árbol obtenido del análisis de los mismos datos con el método *Neighbor-joining* (Figura 1.15), las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum* se separaron marcadamente del resto de las accesiones de *P. sativum*. Además, se pudieron distinguir las subespecies *elatius* y *transcaucasicum*, y las variedades *arvense*, *macrocarpon* y *sativum* de la ssp. *sativum*. Gran parte de las variedades pertenecientes al programa de mejora local, formaron un grupo definido.

En la región del árbol donde se ubican gran parte de los cultivares (*P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum*), las dos entradas marcadas en la figura con un círculo rojo, corresponden a las accesiones que presentan vainas de color violeta en la colección (cod 2 y cod 22).

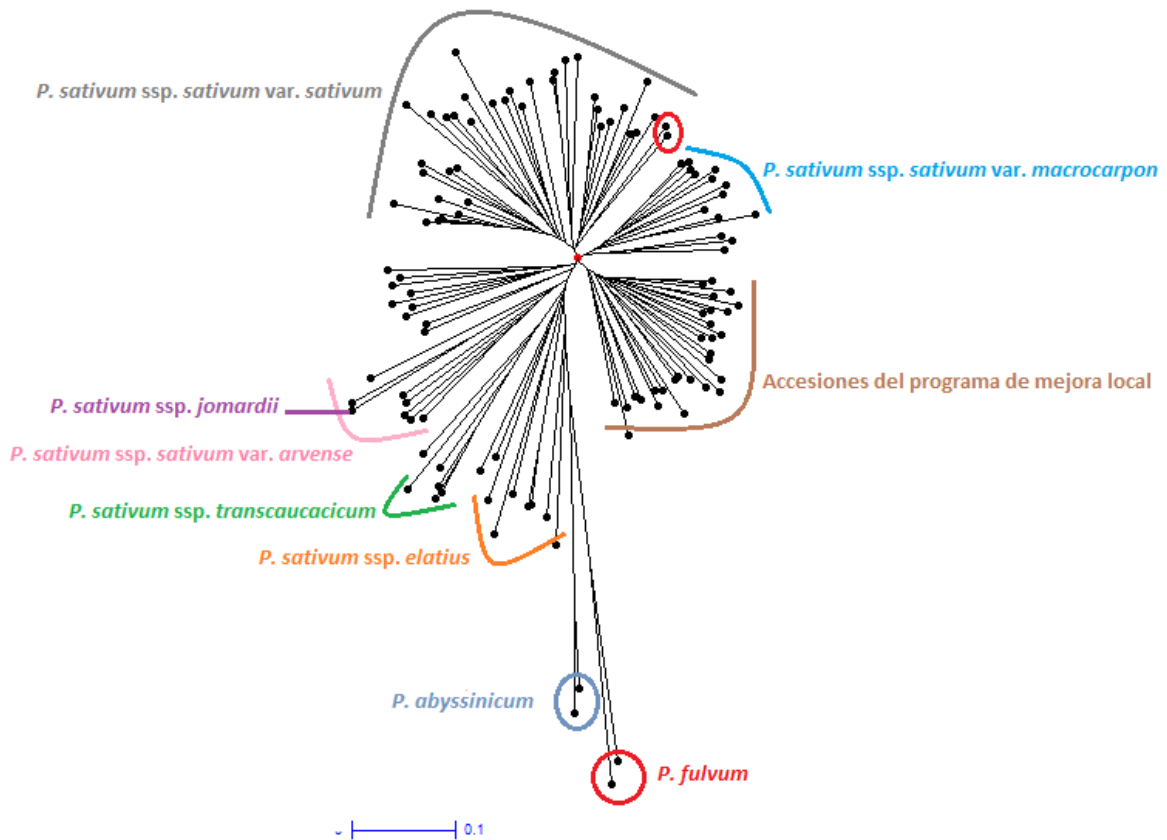


Figura 1.15. Árbol obtenido con el método de *Neighbor-joining* y a partir de los marcadores moleculares SSR y SRAP para las accesiones de la colección de *Pisum*.

Por otro lado, el dendrograma considerando las distintas taxa de *Pisum*, generado usando marcadores SRAP, mostró nuevamente que las accesiones de *P. fulvum* fueron completamente separadas del resto de las accesiones (Figura 16). Las tres especies *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum* se discriminaron con claridad. El primer grupo incluyó solamente accesiones de *P. sativum*. En este primer grupo, la subespecie *transcaucasicum* y la var. *arvense* formaron un subgrupo y, finalmente, las accesiones correspondientes a las var. *macrocarpon* y var. *sativum* constituyeron otro subgrupo.

Además, en el dendrograma de los distintos grupos taxonómicos de *Pisum* utilizando marcadores SSR, también las tres especies fueron separadas (Figura 1.16); pero la subespecie

jomardii se ubicó junto con *P. abyssinicum* en el mismo grupo. Dentro del primer *cluster*, la variedad *arvense*, la subespecie *elatus* y la subespecie *transcausicum* formaron un subgrupo; y las var. *macrocarpon* y var. *sativum* constituyeron otro subgrupo.

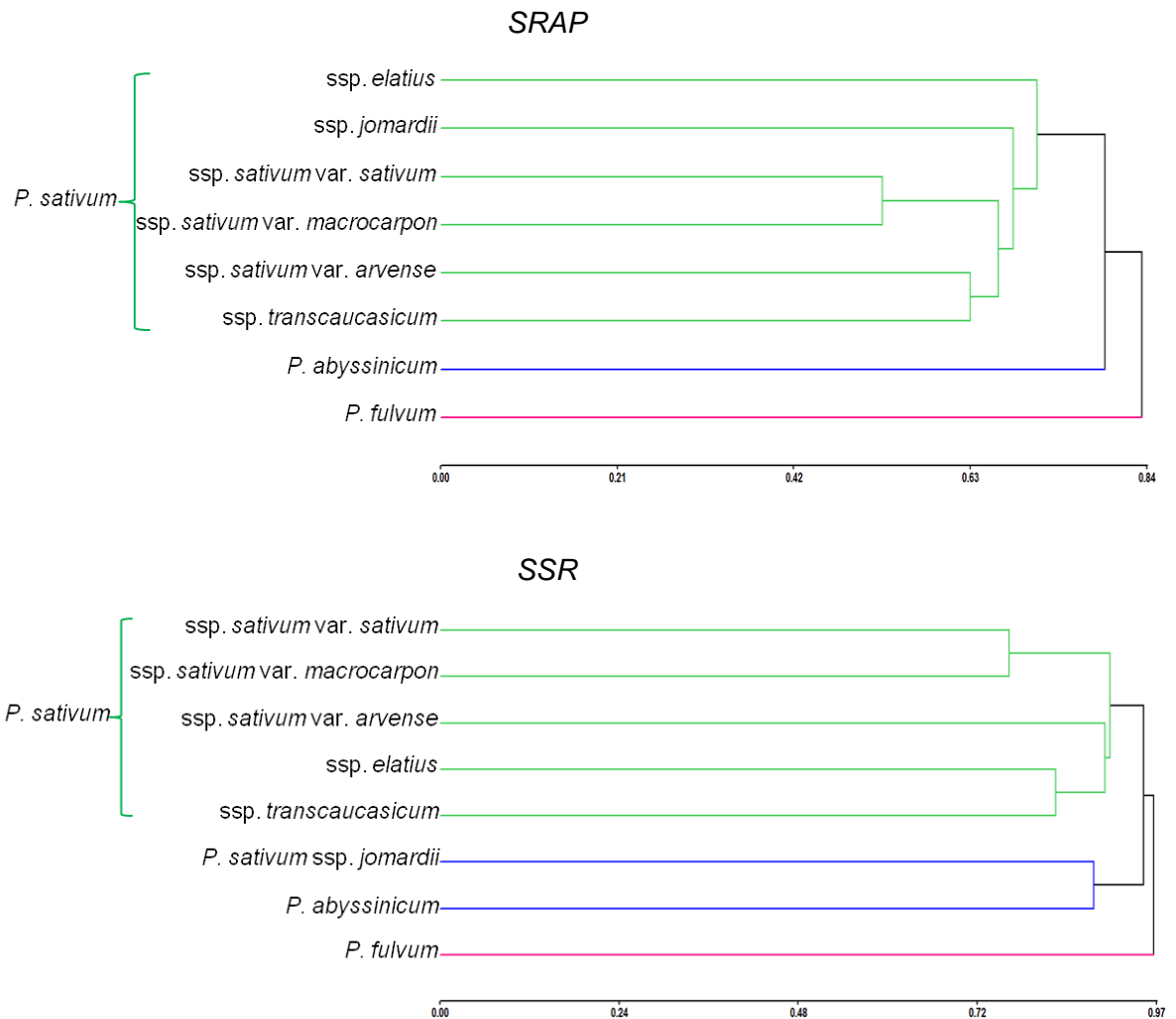


Figura 1.16. Dendrogramas obtenidos a partir de los marcadores moleculares SRAP (superior) y SSR (inferior), mostrando las relaciones genéticas entre los 8 grupos taxonómicos de *Pisum*.

El coeficiente de correlación cofenético obtenido a partir del análisis de agrupamiento de las distintas taxa de *Pisum*, fue de 0,904 para los microsatélites, y de 0,940 para SRAP. Así en los tres análisis de conglomerados realizados usando el método UPGMA, el valor de este coeficiente fue mayor a 0,8. De este modo, las distancias en los dendrogramas reflejan adecuadamente las distancias verdaderas entre las accesiones de la colección.

3.3. ANÁLISIS CONJUNTO DE LA INFORMACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

3.3.1. Análisis de Procrustes Generalizado

Los autovalores indicaron que la variabilidad explicada a través del eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso fue 41,9% (Tabla 1.16 a). Con los dos primeros ejes se explicó el 61,2% de la variabilidad contenida en el total de los marcadores morfológicos y moleculares. En el cuadro de Análisis de la Varianza (Tabla 1.16 b) se presenta la suma de cuadrados por cada grupo de marcadores. A partir del cociente entre el consenso y la suma de cuadrados total (2,329/3,000), se puede concluir que existió un 77,6% de consenso entre los ordenamientos producidos por los marcadores moleculares SSR y SRAP y los marcadores fenotípicos.

Tabla 1.16. Resultados del APG combinando la información proveniente de los caracteres fenotípicos cuantitativos y cualitativos, y de los marcadores moleculares SSR y SRAP.

a)	Autovalores	Valor	Proporción de la variabilidad total explicada	Proporción acumulada
	1	0,320	0,419	0,419
	2	0,147	0,193	0,612
	3	0,102	0,134	0,746
	4	0,086	0,113	0,859
	5	0,068	0,089	0,948
	6	0,040	0,052	1,000

b) Análisis de la Varianza. Sumas de cuadrado por grupo			
	Consenso	Residuo	Total
Grupo 1 (datos moleculares)	1,085	0,112	1,197
Grupo 2 (datos fenotípicos cuantitativos)	0,158	0,448	0,606
Grupo 3 (datos fenotípicos cualitativos)	1,085	0,112	1,197
Total	2,329	0,710	3,000
Consenso entre la caracterizaciones	2,329 / 3,000 = 0,776 (77,6%)		

En el diagrama de dispersión de la ordenación de consenso considerando los dos primeros ejes del APG (Figura 1.17), se observó que los cultivares (*P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum*) y las accesiones de la variedad botánica *macrocarpon*, en general, se agruparon a valores negativos de CP1.

En cambio, *P. fulvum* (cod 109 y 110) y *P. abyssinicum* (cod 41 y 42), junto a la mayoría de las accesiones pertenecientes a los taxa de *P. sativum* diferentes a var. *macrocarpon* y var. *sativum*, se hallaron a valores positivos de CP1 en el gráfico de la configuración consenso. En particular, las accesiones de *P. fulvum* y *P. abyssinicum* se agruparon en el cuarto cuadrante (CP1>0; CP2<0) del gráfico. Por su parte, las accesiones del taxón *elatius* (cod 38, 39, 400, 401, 510 y 511) se encontraron, en general, en forma dispersa en dicho gráfico.

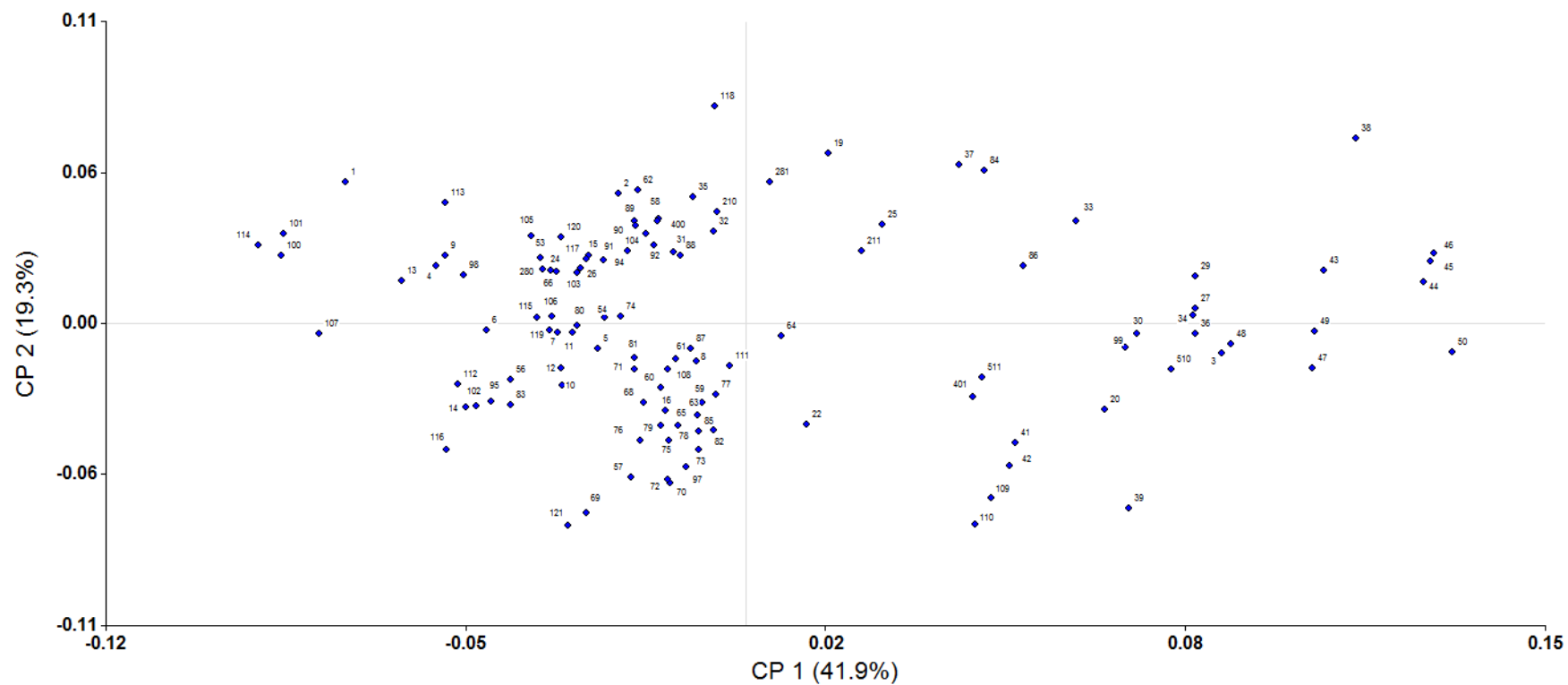


Figura 1.17. Configuración consenso de las accesiones de la colección de *Pisum* conformada por los dos primeros ejes de un APG a partir de los datos fenotípicos y moleculares (SSR y SRAP).

3.3.2. Análisis de Conglomerados

El análisis de agrupamiento considerando en forma conjunta la información fenotípica y molecular, permitió distinguir, en primera instancia, dos grupos (Figura 1.18). Por un lado, las accesiones pertenecientes a las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum*; y por el otro, las accesiones de *P. sativum*.

Se seleccionó el dendrograma resultante del agrupamiento usando el método de Encadenamiento Completo; ya que este último generó una mejor descripción de la colección de trabajo y presentó un coeficiente de correlación cofenético de 0,822.

A una distancia de 0,47 se diferenciaron siete grupos, identificados con diferentes colores en el dendrograma. Al analizar cada uno de estos grupos se encontró que:

- G1 y G2 correspondieron a *P. abyssinicum* y *P. fulvum*, respectivamente. Dentro de G2 la accesión CE-1 (cod 39) de la ssp. *elatius* se asoció a las accesiones de *P. fulvum*.
- Dentro del grupo G3, las accesiones de la ssp. *transcaucasicum* de *P. sativum* se asociaron junto con la accesión VIR 3115 (cod 38) de la ssp. *elatius*.
- El grupo G4 estuvo formado por entradas de la variedad botánica *arvense* de *P. sativum* y por Romack (cod 3) de *P. sativum*.
- El grupo G5 correspondió a las accesiones Jomardii (cod. 99), 1-826a (cod 48) y Aa38 (cod.33).
- En grupo G6 las restantes accesiones de la ssp. *elatius* (cod. 400, 401, 510, 511) formaron un pequeño subgrupo junto a Shandil (cod 20), No. 338[22] (cod 27), Moshong (cod 29), ILCA 5073 (cod 36) y 1897 (cod 43). El resto de las accesiones de este grupo G6 son cultivares (variedad *sativum*).
- El grupo G7 estuvo formado por accesiones pertenecientes a las variedades botánicas *sativum* y *macrocarpon*.

La información brindada por el APG y el Análisis de Conglomerados, se utilizó como punto de partida para la construcción de la Colección Núcleo en sí misma.

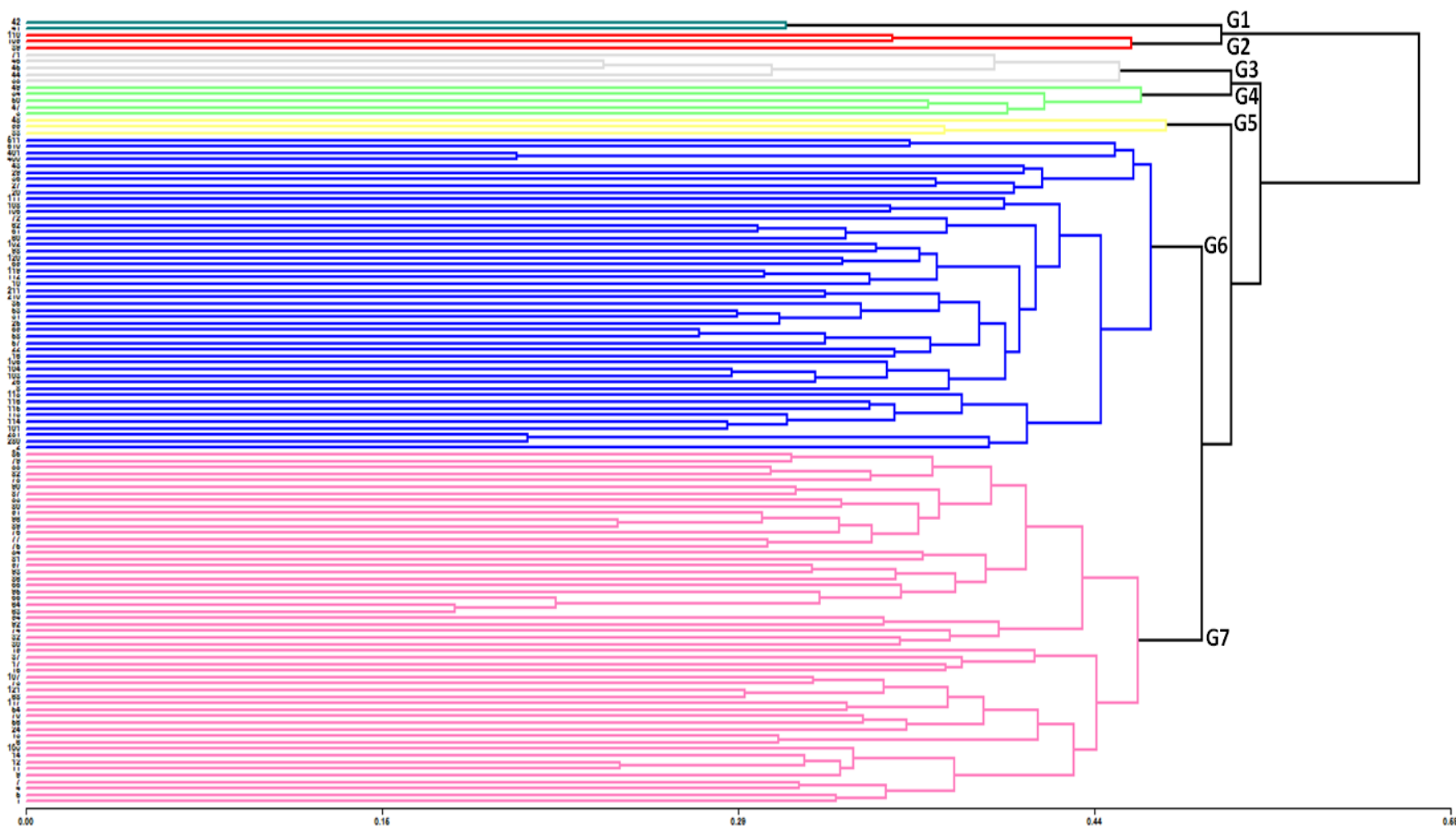


Figura 1.18. Dendrograma obtenido a partir de los descriptores fenotípicos y de los marcadores moleculares SSR y SRAP ilustrando las relaciones genéticas entre las accesiones de *Pisum* de la colección activa.

CAPÍTULO 2:

ESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN NÚCLEO

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar diversas metodologías para seleccionar un subconjunto núcleo de accesiones representativo de la colección activa.
- Determinar el menor número de accesiones que representen la mayor parte de la variabilidad presente en la colección original.
- Validar las colecciones núcleo conformadas a fin de obtener aquella que reúna una mayor representatividad con un mínimo de redundancia genética.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de los análisis de la variabilidad existente en la colección activa (CA) de *Pisum*, se procedió a la construcción de una colección núcleo a fin de conservar la mayor parte de la variabilidad incluyendo un mínimo de accesiones. Se aplicaron diferentes metodologías que permitieron obtener distintas colecciones núcleo, para luego elegir aquella que sea más representativa de la colección original.

2.1. FORMACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO

2.1.1. Estratificación

Se evaluaron dos criterios de estratificación: E1 y E2, para definir los grupos de accesiones en función de sus similitudes a nivel morfológico y molecular.

Para el primer criterio (E1), se realizó un análisis de agrupamiento sobre el conjunto total de accesiones de la colección de trabajo (CA), considerando los datos morfológicos y moleculares; tal como se detalló en el capítulo anterior.

Para el segundo criterio (E2) se consideró la taxonomía. Así, inicialmente, se estableció una primera división, considerando por un lado, los cultivares (ssp. *sativum* var. *sativum*), y por el otro, el resto de las subespecies y especies. Esto fue debido a que la colección de partida presentó un gran número de cultivares en comparación con el número de accesiones de las restantes taxa del género *Pisum*. Además, el empleo de este criterio se basó en los resultados del APG; donde en el diagrama de dispersión (Figura 1.17, Capítulo 1), los cultivares formaron un grupo aislado de resto de las accesiones de la colección.

Luego, se realizó un análisis de agrupamiento a cada grupo (cultivares y *no* cultivares) en forma separada, utilizando los mismos criterios que en E1 (Distancias de Gower – Método de Encadenamiento Completo).

2.1.2. Determinación del número de accesiones a incluir en la colección núcleo

Se estableció que la colección núcleo (CC) debería incluir entre un 10% y un 30% de las accesiones pertenecientes a la colección inicial. Teniendo en cuenta el número inicial de accesiones, dentro de este rango de porcentaje se lograría mantener la totalidad de la diversidad genética presente en la colección original (Brown, 1989a; Noirot *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2003).

Para definir el número de accesiones de cada grupo que integraron la CC, se consideraron tres estrategias propuestas por Brown (1989b):

a) **Estrategia Fija (F)**, según la cual se seleccionaron igual cantidad de entradas en cada grupo, independientemente del número de accesiones que integran cada uno de ellos.

b) **Estrategia Logarítmica (L)**, en la cual se aplicó el logaritmo con base 1,8 al número de accesiones presentes en cada grupo, para definir el número de entradas elegidas por grupo. La base de esta función se definió en función del porcentaje de accesiones de la colección inicial que se incluyeron en la CC. Si este cálculo no resultó en un número entero se redondeó al número entero más cercano.

c) **Estrategia Proporcional (P)**, en la cual, el número de entradas seleccionadas de cada grupo es una fracción fija del número de accesiones que integran cada uno. El factor de proporcionalidad utilizado fue $2/7$; y nuevamente, de ser necesario, se redondeó el resultado al número entero más cercano.

Por otra parte, también se aplicó una cuarta estrategia llamada **Estrategia M** (Schoen y Brown, 1995). Con la misma se examinan todas las posibles colecciones núcleo que pueden formarse con el total de accesiones disponibles y se señala la que maximiza el número de alelos observados en los loci marcadores. Esta estrategia emplea los datos obtenidos de los marcadores moleculares con criterio determinístico y no en forma estadística. Aplicando un programa lineal, selecciona la combinación de accesiones que maximice el número de alelos observados para formar la colección núcleo, garantizando, por tanto, la inclusión de la máxima riqueza alélica. La estrategia M no sólo define el número de accesiones que deben formar la colección núcleo, sino que también, identifica cuáles son las accesiones que deben ser incluidas. Para aplicar la estrategia M se utilizó el programa PowerCore (v. 1.0) (Kim *et al.*, 2007).

2.1.3. Selección de accesiones

Una vez establecidos el número de grupos y el número de accesiones a seleccionar dentro de cada grupo, debe determinarse para las estrategias F, L y P en los diferentes criterios de estratificación, cuáles serán las entradas que integrarán la CC. Con este fin, se calculó el valor medio y la varianza de cada grupo para cada una de las variables cuantitativas fenotípicas evaluadas. Posteriormente, se seleccionaron dentro de cada grupo, aquellas accesiones que en conjunto permitieron mantener, para la mayoría de las variables cuantitativas, dichos valores de medias y variancias del grupo. En general, esto se alcanzó seleccionando las accesiones con fenotipos extremos dentro de cada grupo, a efectos de maximizar la diversidad. En grupos con subdivisiones, se procuró elegir accesiones de cada subgrupo.

Además, para la elección de las entradas se tuvo en cuenta la información de los datos cualitativos, así como también otros aspectos, tales como: disponibilidad de material, datos de pasaporte e interés de los usuarios.

2.2. VALIDACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO

A fin de definir el grado de representatividad de cada una de las colecciones núcleos conformadas, se comparó la variabilidad presente en cada una de ellas con respecto a la colección activa (CA) o inicial. Esta operación de validación se realizó tanto a nivel morfológico como a nivel molecular.

2.2.1. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel morfológico

Se estimaron a partir de las variables cuantitativas, tanto en la colección original como en cada una de las CC, los siguientes parámetros (Hu *et al.*, 2000a,b; Kim *et al.*, 2007):

- 1) Diferencias de valores medios [MD]

$$[MD] = (St/m) \times 100$$

Dónde: St es el número de variables que presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los valores promedio de la colección inicial y la CC, y “m” es el número total de variables.

La significancia estadística de la diferencia entre valores medios se estableció a través de una prueba t.

2) Diferencia relativa porcentual de valores medios (MD%)

$$MD\% = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{|Me - Mc|}{Mc} \times 100$$

Dónde: Me = valor promedio para cada una de las variables en la colección inicial, Mc = valor promedio para cada una de las variables en la CC, m= número de variables.

3) Diferencias de varianzas [VD]

$$[VD] = (St/m) \times 100$$

Dónde: St es el número de variables que presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) de varianzas entre la colección inicial y la CC, y “m” es el número total de variables. La significancia estadística de la diferencia entre valores medios se estableció a través de una prueba t.

4) Diferencia relativa porcentual de varianzas (VD%)

$$VD\% = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{|Ve - Vc|}{Vc} \times 100$$

Donde: Ve= varianza observada en cada variable en la colección inicial, Vc= varianza observada en cada variable en la CC, m= número de variables.

5) Porcentaje de coincidencia de rango (CR%)

$$CR\% = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{Rc}{Re} \times 100$$

Donde Rc= rango de cada variables en la CC, Re= rango de cada variable en la colección inicial, y “m” = número de variables.

6) Porcentaje de coeficiente de variación (VR%)

$$VR\% = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{CVc}{CVe} \times 100$$

Donde CVC= coeficiente de variación de cada variable en la CC, CVE= coeficiente de variación de cada variable en la colección inicial, y “m” es el número de variables.

Una colección núcleo se consideró representativa del conjunto inicial de accesiones cuando simultáneamente: MD y VD \leq 20%, CR% \geq 80% y VR% \geq 100% (Hu et al., 2000a; Diwan *et al.*, 1995). Cuanto menor resultó MD y mayor los porcentajes de CR y VR, más representativa fue la colección núcleo.

A partir de las variables cualitativas, se estimó para cada colección el Índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon y Weaver, 1949; Lewontin, 1972), cuya expresión es:

$$SW = - \sum_{i=1}^S P_i \times \log_2 P_i$$

donde S es el número total de tipos de descriptores estudiados y P_i es una medida de la abundancia relativa de cada uno de éstos tipos. La significancia estadística de la diferencia entre el valor de este índice de diversidad en la CA y las distintas CCs se estableció a través de una prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.2.2. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel molecular

Para validar las colecciones núcleo a nivel molecular, se calcularon, tanto para la colección inicial como para cada una de las CCs, distintas medidas de diversidad utilizando el programa InfoGen/P (Balzarini y Di Rienzo, 2003). Estas medidas fueron comparados mediante una prueba de Friedman ($\alpha = 0,05$).

Con los datos provenientes de los marcadores microsatélites los parámetros calculados para cada colección fueron: el número de alelos (A), el número efectivo de alelos (A_e) y la Diversidad Genética (H) y el PIC, como se detalló en la sección 2.3.4.1. de los Materiales y Métodos del Capítulo 1. Para el caso de los marcadores SRAP se calcularon: H, PIC y el nivel de polimorfismo (P).

Finalmente, se compararon los valores de los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver entre las colecciones los cuales fueron estimados teniendo en cuenta ambos tipos de marcadores moleculares (SSR y SRAP).

Se consideró que una colección núcleo es representativa de la colección inicial cuando los parámetros mencionados permanecen invariables entre ambas (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

2.2.3. Evaluación de las colecciones núcleo definitiva a nivel fenotípico y molecular

La colección núcleo seleccionada entre todas las posibles CCs conformadas, se comparó con la colección original por medio de la distribución espacial de las accesiones de ambas colecciones en un diagrama de dispersión. Este diagrama, el cual mostró la ordenación de consenso, se obtuvo con anterioridad a partir del Análisis de Procrustes Generalizado en la sección 3.3.1. de los Resultado del Capítulo 1 (Figura 1.17).

3. RESULTADOS

3.1. FORMACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO

3.1.1. Estratificación

3.1.1.1. Aplicación del criterio E1

Tal como se detalló en el Capítulo 1, del análisis de conglomerados de la colección activa considerando tanto la información fenotípica como molecular (SSR y SRAP), se obtuvieron siete grupos (Figura 1.18). Estos grupos permitieron, en general, separar las tres especies: *P. abyssinicum* (G1), *P. fulvum* (G2) y *P. sativum* (G3-G7); y dentro de esta última especie, discriminar las diferentes subespecies y variedades.

Dichos siete grupos fueron los seleccionados para continuar con el proceso de construcción de las distintas CCs utilizando el criterio de estratificación E1.

3.1.1.2. Aplicación del criterio E2

El análisis de agrupamiento realizado luego de la estratificación entre los cultivares (*P. sativum* ssp. *sativum* var *sativum*) y el resto de las accesiones de la colección original, permitió la conformación de dos dendrogramas.

El primer dendrograma, obtenido a partir de los 95 cultivares, presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,747 (Figura 2.1). En dicho gráfico, se distinguieron dos grupos principales.

El primer grupo (G1) de menor tamaño, estuvo formado, por un lado, por las accesiones Shandil (cod 20), No. 338[22] (cod 27), Moshong (cod 29) y Ilca 5073 (cod 36) que constituyeron un subgrupo (G1A), y, por otro lado, por las accesiones Romack (cod 3), Aa38 (cod 33) y Ilca 5041 (cod 34) que integraron otro subgrupo (G1B). Los cultivares del G1 se caracterizaron por presentar flores coloreadas, granos verde amarronados de diámetro pequeño y floración tardía.

El segundo grupo (G2), de mayor tamaño, se subdividió en dos subgrupos: G2A y G2B. El G2A presentó 29 accesiones con flores de color blanca, con excepción de Chinese Purple (cod 30) y C2001 (cod 86). De estas 29 entradas, 16 correspondieron al programa de

mejoramiento local: ZAV5, ZAV10, ZAV12, ZAV15, ZAV17, ZAV18, ZAV19, ZAV20, ZAV21, ZAV22, ZAV23, ZAV25, ZAV26, C2001, AMARILLA y APARECIDA. Dentro del G2B, de mayor tamaño y formado por 59 accesiones, se encontraron los cultivares precoces y con calibre mayor de grano. Además, se ubicaron las dos accesiones de la colección con vaina violeta: King Tut-Purple Pod (cod 2) y NGB (cod 22), pero en *clusters* diferentes. Los 21 cultivares de la colección provenientes del banco de JIC (*John Innes Centre*) (cod: 98, 100-108, 111-121), se agruparon en SG2. En estos cultivares se incluyó al cultivar primitivo Arveja Blanca de Sogamso (cod 111) y la accesión P. Axiphium (cod 118).

En el caso de este primer dendrograma obtenido para los cultivares, se consideraron un total de 6 grupos para continuar con el proceso de elaboración de las CCs. Estos grupos quedaron definidos al realizar un corte en dicho dendrograma a una distancia de 0,50 (Anexo, Figura 1a); lo cual permitió separar el gran conjunto G2B en tres grupos.

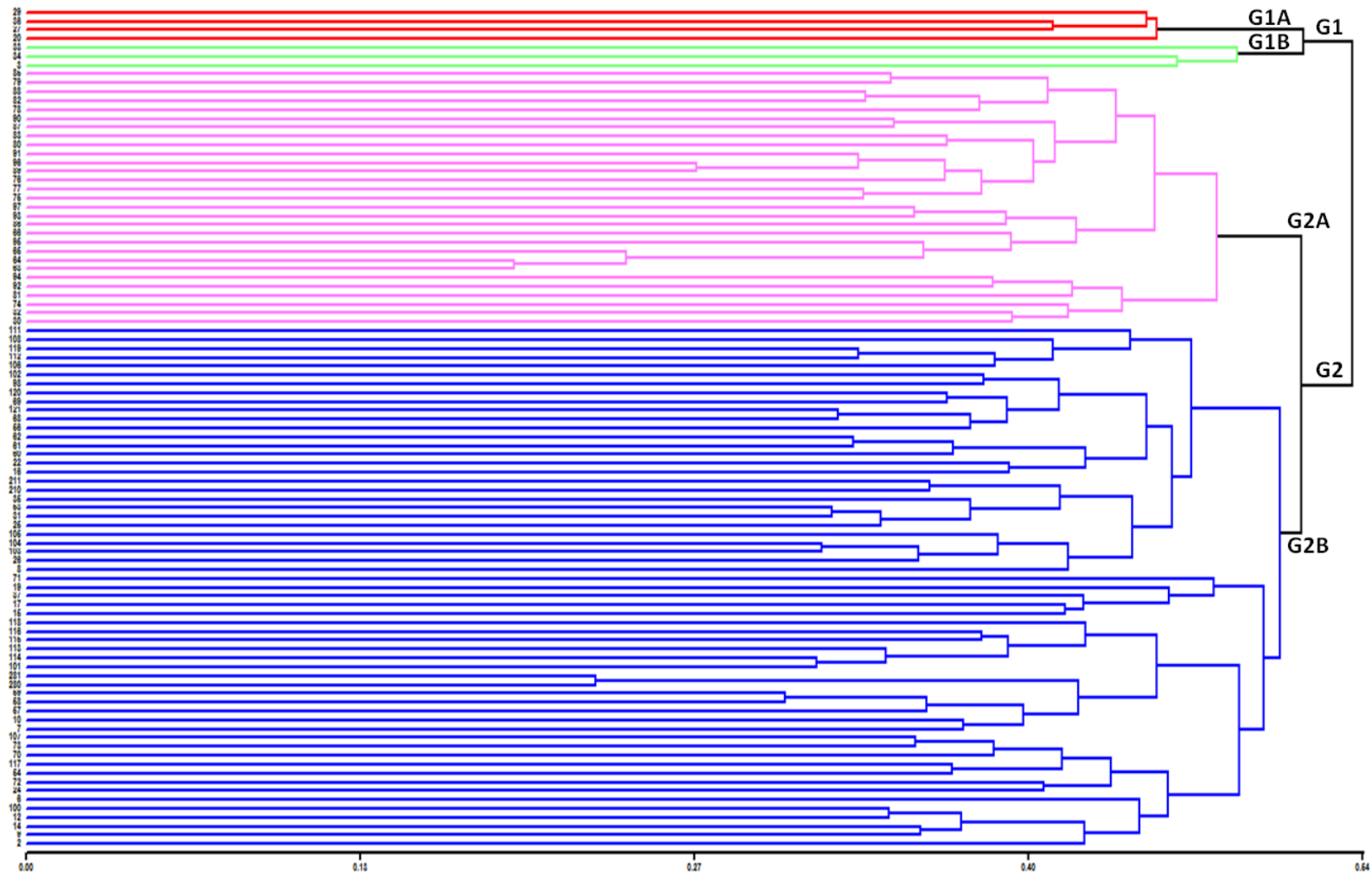


Figura 2.1. Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados de las 95 accesiones de *P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum* de la colección original.

El segundo dendrograma, obtenido a partir de las 25 accesiones restantes (Figura 2.2), presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,906. En este dendrograma se encontró una clara separación entre las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum* (G1), y el resto de las subespecies de *P. sativum* (G2). Dentro G1 las especies se separaron y las accesiones de *P. fulvum* aparecieron relacionadas con la entrada CE-1 (cod 39). Esta última accesión, clasificada taxonómicamente como *P. sativum* ssp. *elatius*, presentó un fenotipo silvestre mostrando características tales como un número chico de pares de folíolos, baja altura de planta, y tamaño pequeño de folíolos, flores, vainas y granos.

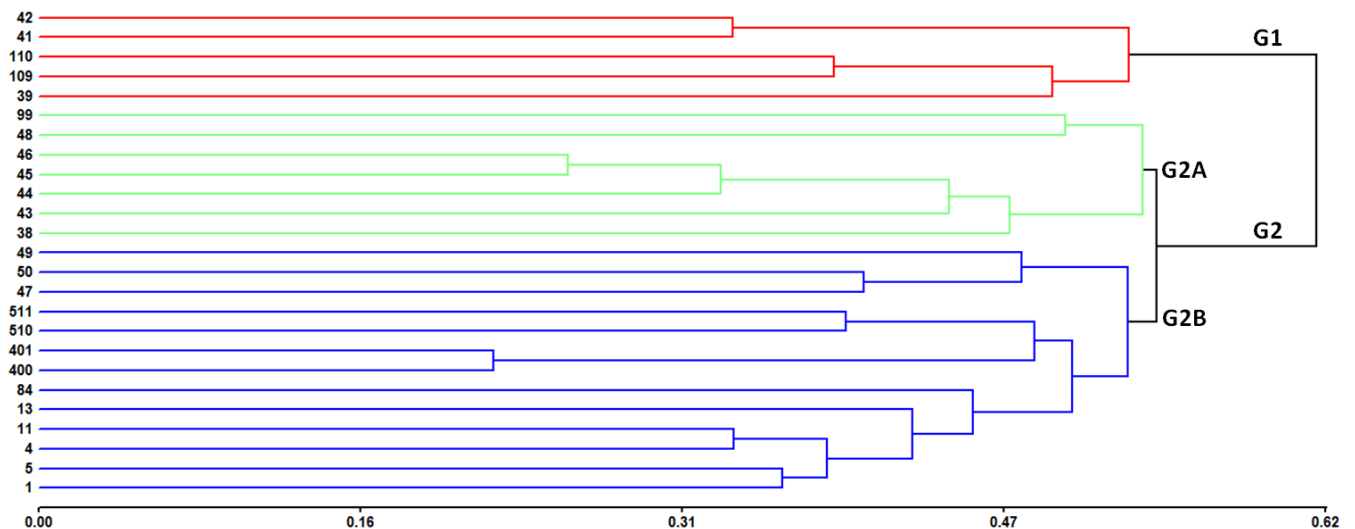


Figura 2.2. Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados de las accesiones de la colección original que no pertenecen al taxón *P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum*.

En el G2 agruparon las accesiones correspondientes a las ssp. *transcaucasica* y *jomardii*, y las variedades *arvense* y *macrocarpon* de las ssp. *sativum*. Dentro del subgrupo G2A se encontraron, por un lado, las tres entradas de la ssp. *transcaucasica* (cods 44, 45 y 46), junto a Morocco (cod 43) y Vir 3115 (cod 38). Morocco, clasificada como *abyssinicum* en el banco de USDA, mostró un fenotipo muy diferente a las dos accesiones correspondientes al taxón *abyssinicum*; y Vir 3115 pertenece al taxón *elatius*. Por otro lado, en G2A, Jomardii (cod 99) se asoció 1-826a (cod 48). Esta última accesión, y también en menor medida Vir 3115, mostraron no ser líneas puras tanto a nivel morfológico como molecular. En la caracterización morfológica, 1-826a mostró tres fenotipos distintos con granos: moteados; moteados y beteados; y lisos. Además, estos fenotipos presentaron variantes en el borde de sus folíolos (lisos o aserrados).

En el subgrupo G2B, por un lado, estuvieron las entradas de la var. *arvense* (cods 47, 49 y 50); y por otro, agruparon las correspondientes al taxón *elatius* (cods 400, 401, 510 y 511), junto a la variedad *macrocarpon* (cods 1, 4, 5, 11, 13 y 84).

En el caso de este segundo dendrograma obtenido para los *no* cultivares, se consideraron un total de 3 grupos para continuar con el proceso de elaboración de las CCs, marcados con diferentes colores en la figura 2.2. Estos grupos quedaron definidos al realizar un corte nuevamente a una distancia de 0,50 en dicho dendrograma (Anexo, Figura 1b).

Así, finalmente, con el criterio de estratificación E2 se consideraron 9 grupos, de los cuales 6 correspondieron a los cultivares y 3 corresponden a resto de las taxa de *Pisum*.

3.1.2. Determinación del número de accesiones a conformar la colección núcleo

Considerando que el tamaño de la CC debía ser entre un 10% a 30% de aquel de la colección activa (Sección 2.1.2., Materiales y Métodos) y teniendo 120 entradas caracterizadas tanto fenotípicamente como con ambos sistemas moleculares; se estableció que la CC debería estar formada por un número variable de 12 a 36 accesiones.

La combinación de los dos criterios de estratificación (E1 y E2) y las tres estrategias para determinar el número de accesiones (F, L y P), generó seis posibles colecciones núcleo. Además, dos colección núcleo adicionales resultaron del empleo de la estrategia M (Figura 21).

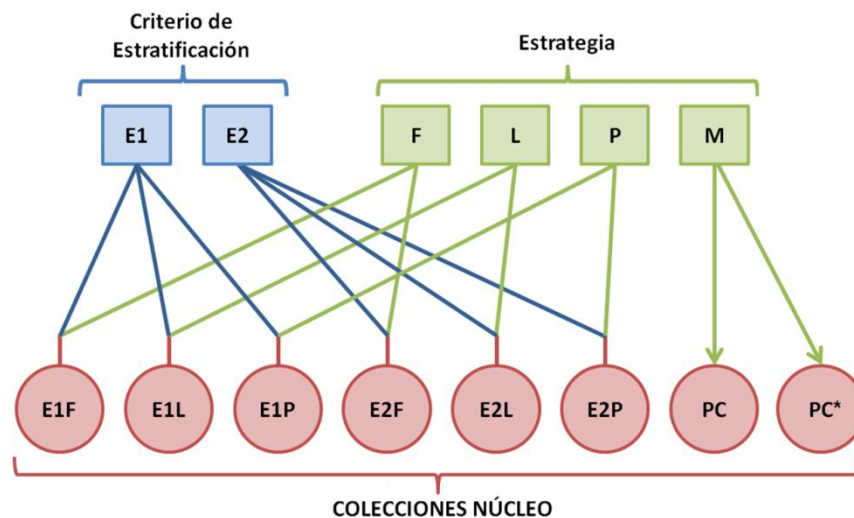


Figura 2.3. Diagrama mostrando las 8 posibles colecciones núcleo obtenidas al combinar los diferentes criterios de estratificación y las estrategias.

Al utilizar el criterio E1 las tres posibles colecciones núcleo presentaron un tamaño de: 14, 25 y 34 accesiones, utilizando las estrategias F, L y P, respectivamente (Tabla 2.1). En la Tabla 2.1 se presentan el número de entradas que se asignaron a cada uno de los siete grupos según la estrategia usada. Así, se pudo observar diferencias notables en dichas asignaciones. Por ejemplo, en el grupo 7, que tuvo un total de 54 accesiones en la colección activa, el número de accesiones finales fue 2, 7 o 15 según la estrategia.

Tabla 2.1. Asignación del número de accesiones a diferentes grupos de la colección según la estrategia fija (F), logarítmica (L) y proporcional (P) para el criterio de estratificación E1. CA=Colección Activa; CC=Colección Núcleo.

<i>Estratificación E1</i>					
Grupos	Nro. de accesiones en la CA	Códigos de accesiones	Nro. de accesiones de la CC		
			F	L	P
1	2	41 y 42	2	1	1
2	3	39, 109 y 110	2	2	1
3	5	38, 44, 45, 46 y 71	2	3	1
4	5	3, 34, 47, 49 y 50	2	3	1
5	3	33, 48 y 99	2	2	1
6	48	2, 8, 10, 16, 20, 22, 25-27, 29, 31, 35, 36, 43, 53, 57-62, 69, 72, 98, 101-106, 108, 111-116, 118-120, 210, 211, 280, 281, 400, 401, 510 y 511	2	7	14
7	54	1, 4-7, 9, 11-15, 17, 19, 24, 30, 32, 37, 54, 56, 63-68, 70, 73-97, 100, 107, 117 y 121	2	7	15
Total	120 (100%)		14(11,7%)	25(20,8%)	34(28,3%)

Considerando el criterio E2, las tres potenciales CCs tuvieron un tamaño de: 18, 34 y 33 accesiones, usando las estrategias F, L y P, respectivamente (Tabla 2.2). En este caso, si bien

se encontraron diferencias al determinar el número de accesiones en cada grupo entre las distintas estrategias, las mismas no son tan marcadas.

Tabla 2.2. Asignación del número de accesiones a diferentes grupos de la colección según la estrategia fija (F), logarítmica (L) y proporcional (P) para el criterio de estratificación E2. CA=Colección Activa; CC=Colección Núcleo.

Estratificación E2					
Grupos	Nro. de accesiones en la CA	Códigos de accesiones	Nro. de accesiones de la CC		
			F	L	P
Cultivares					
1	4	20, 27, 29 y 36	2	2	1
2	3	3, 33 y 34	2	2	1
3	29	30, 32, 63-66, 74-83, 85-97	2	6	8
4	28	8, 16, 22, 25, 26, 31, 35, 53, 56, 60-62, 68, 69, 98, 102-106, 108, 111, 112, 119-121, 210 y 211	2	6	8
5	5	15, 17, 19, 37 y 71	2	3	1
6	26	2, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 24, 54, 57-59, 70, 72, 73, 100, 101, 107, 113-118, 280 y 281	2	5	7
No cultivares					
1	5	39, 41, 42, 109 y 110	2	3	1
2	7	38, 43-46, 48, 99	2	3	2
3	13	1, 4, 5, 11, 13, 47, 49, 50, 84, 400, 401, 510 y 511	2	4	4
Total	120(100%)		18(15,0%)	34(28,3%)	33(27,5%)

3.1.3. Selección de accesiones

Con el propósito de seleccionar las entradas de cada grupo que integrarían la CC, se calcularon, inicialmente, las medias y varianzas de cada grupo para cada variable morfológica cuantitativa tomando todas las accesiones de la colección inicial (Anexo, Tablas 7 y 8,). Esto se realizó para los dos criterios de estratificación (E1 y E2).

Luego, las accesiones de cada grupo, fueron elegidas considerando aquellas que mostraron los valores más extremos para las distintas variables, y que en conjunto presentaron un promedio similar al del grupo de pertenencia. Este proceso se desarrolló respetando el número de entradas de cada grupo que había sido definido previamente, según el tipo de estrategia. Los valores medios que presentaron las variables en cada accesión se expusieron en el Capítulo 1 (Anexo, Tabla 4).

Finalmente, se muestran en las tablas 2.3 y 2.4, las accesiones definitivas que integraron las CCs según el criterio E1 y E2, respectivamente.

En las seis CCs formadas, independientemente del criterio o metodología utilizado para su construcción, existen siete entradas que se mantienen constantes. Los códigos de estas accesiones son: 2 (cultivar), 41 (*P. abyssinicum*), 45 (*P. sativum* ssp. *transcaucasicum*), 49 (*P. sativum* ssp. *sativum* var. *arvense*), 83 (cultivar), 99 (*P. sativum* ssp. *jomardii*) y 111 (cultivar primitivo). En todas las CCs se encontró la accesión cod. 110 (*P. fulvum*), con excepción de la colección E2P. Además, las CCs tuvieron alguna accesión perteneciente al taxón *elatius*, salvo la colección E2F. Por último, todas las colecciones presentaron a la entrada cod. 5 (*P. sativum* ssp. *sativum* var. *macrocarpon*), exceptuando la colección E1F.

Tabla 2.3. Accesiones que integran cada CC para el criterio E1.

Grupos	Código de accesiones de la CC		
	E1F	E1L	E1P
1	41 y 42	41	41
2	39 y 109	39 y 109	109
3	38 y 45	38, 45 y 71	45
4	47 y 49	34, 47 y 49	49
5	48 y 99	48 y 99	99
6	2 y 111	2, 20, 60, 104, 111, 401 y 510	2, 20, 25, 36, 60, 98, 106, 111, 114, 118, 120, 281, 401 y 510
7	83 y 100	5, 15, 30, 83, 94, 97, 100	5, 12, 13, 15, 19, 63, 70, 74, 77, 80, 83, 84, 93, 94, 100
Total	14 (11,7%)	25(20,8%)	34(28,3%)

Tabla 2.4. Accesiones que integran cada CC para el criterio **E2**.

Grupos	Código de accesiones de la CC		
	E2F	E2L	E2P
Cultivares			
1	20 y 36	20 y 36	36
2	3 y 33	3 y 33	33
3	74 y 83	63, 74, 77, 83, 94, 97	30, 63, 74, 77, 80, 83, 94, 97
4	69 y 111	8, 31, 56, 69, 104 y 111	8, 31, 56, 60, 69, 104, 111, 112
5	15 y 71	15, 37 y 71	15
6	2 y 101	2, 24, 59, 101 y 118	2, 24, 59, 101, 107, 116 y 118
No Cultivares			
1	41 y 109	39, 41 y 109	41
2	45 y 99	45, 48 y 99	45 y 99
3	5 y 49	5, 49, 401 y 510	5, 49, 401 y 510
Total	18(15,0%)	34(28,3%)	33(27,5%)

Al comparar las medias de cada grupo entre la CA y cada CC, se encontraron diferencias no significativas al 5%, en todas las variables cuantitativas y para todas las colecciones núcleo E1 y E2 (Anexo, Tablas 7 y Tabla 8).

3.1.4. Estrategia M

Al utilizar el programa PowerCore 1.0 para obtener una séptima colección núcleo (PC), a partir de la información tanto fenotípica como molecular, se encontró que la colección resultante estaba conformada por 58 accesiones. Este número representó un 48,3% del tamaño original de la CA; valor que excedió en gran medida al tamaño definido previamente para la CC. Se estipuló previamente que con un tamaño entre el 10% y 30% de la colección inicial, se lograría capturar la diversidad genética existente con un bajo grado de redundancia.

Debido a esto, se desarrolló una octava colección núcleo (PC*) usando nuevamente el programa PowerCore 1.0, pero considerando sólo la información fenotípica (cuantitativa y cualitativa). Esta colección PC* quedó constituida por 23 accesiones, siendo un 19,2% del tamaño original de la CA.

Cabe aclarar que, la generación de una CC por medio del PowerCore considerando sólo la caracterización molecular, también llevo a un tamaño superior al preestablecido (44,2%); por lo cual se consideró seguir evaluando únicamente las colecciones PC y PC*.

En la tabla 2.5, se presentan las entradas que conformaron las colecciones núcleo PC y PC* desarrollada utilizando la estrategia M. Si bien esta CC presenta un número elevado de entradas, de las siete accesiones mencionadas previamente que se encontraron en todas las demás CCs, sólo cuatro integran la colección PC. Estas últimas son (cod): 41, 49, 99 y 111. Las accesiones cod 5 y cod 109, al igual que en la mayoría de las restantes CCs, forman parte de PC.

Tabla 2.5. Accesiones que integran la CC obtenida aplicando la estrategia M.

	PC	PC*
Código de las accesiones de la CC	1, 3, 5, 8-10, 16, 17, 19, 20, 22, 27, 29, 30, 32-34, 36-39, 41-44, 46, 48, 49, 50, 54, 59, 61, 62, 71, 72, 74, 81, 85, 88-90, 98-100, 102, 105, 109-112, 114, 115, 118, 120, 280, 400, 510 y 511	1, 2, 6, 17, 29, 35, 36, 38, 41, 46, 47, 49, 50, 56, 78, 85, 100, 109, 112, 114, 115, 118, 120
Total	58(48,3%)	23(19,2%)

3.2. VALIDACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO

3.2.1. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel morfológico

Al contrastar la colección original contra las ocho colecciones núcleo en cuanto a los valores promedio de las variables cuantitativas evaluadas, se encontró que tres de las CCs presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) y/o altamente significativas ($p < 0,01$) (Tabla 2.6a). Estas fueron E1F, E1L y E2F; lo cual se reflejó en sus valores de $[MD] = 43,75\%$ y $[MD] = 18,75\%$ y $[MD] = 12,50\%$ respectivamente. Teniendo en cuenta que para que una CC sea representativa el valor límite de esta diferencia de promedios es del 20% ($[MD] \leq 20\%$), la colección E1F no fue validada.

Considerando las diferencias relativas porcentuales de valores medios (MD%), las colecciones E1P, E2L, E2P y PC presentaron los menores porcentajes, lo cual reflejó la mayor semejanza de sus valores medios con respecto a aquellos de la colección activa (Tabla 2.6a).

En cuanto a las diferencias de varianzas, las colecciones E1F, E1L y PC*, mostraron diferencias significativas y/o altamente significativas (Tabla 2.6b). Sin embargo, si se considera la cota de $[VD] \leq 20\%$ para ser una CC representativa, de estas tres colecciones, E1F y PC* serían excluidas, junto a la colección PC. Además, la evaluación de las diferencias relativas porcentuales de varianzas (VD%), indicó que las E1P, E2L y E2P fueron las colecciones más apropiadas al presentar menores valores de este parámetro. Es decir, que sus varianzas resultaron muy próximas a las de la CA.

Todas las CCs presentaron valores de Porcentajes de coincidencia de rango (CR%) mayores al 80%, con excepción a E2F; condición necesaria para ser CCs representativas (Tabla 2.6c). Las colecciones E1P y E2L mostraron valores muy elevados cercanos al 90%, y las colecciones PC y PC*, próximos al 100%.

Por último, una colección debe presentar un Porcentaje de coeficiente de variación (VR%) mayor o igual al 100% para ser validada; y cuanto más elevado sea este porcentaje, mayor será la representatividad. Las colecciones E2P presentó un valor inferior al 100% para dicho parámetro; y, por el contrario, las siete restantes CC, un valor superior al 100%.

Así, considerando todos los parámetros en forma simultánea, las colecciones núcleo que mostraron ser más representativa hasta el momento, fueron E1P y E2L; ya que tuvieron valores

de [MD] y [VD] iguales a cero, pequeñas diferencias relativas de promedios y varianzas, y valores elevados de CR% y VR%.

Tabla 2.6. Diferencias de valores promedio **(a)** y de varianzas **(b)** para todas las variables fenotípicas entre cada una de las colecciones núcleo conformadas y la colección inicial; y demás parámetros: [MD]= Diferencia de valores medios y MD%= Diferencia relativa porcentual de valores medios **(a)**; [VD]= Diferencia de varianzas; VD%= Diferencia relativa porcentual de varianzas **(b)**; CR% = Porcentaje de coincidencia de rango; VR%= Porcentaje de coeficiente de variación **(c)**.

a)	Variable	CA	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
<i>Promedios</i>										
	AP	104,5	107,3 ^{ns}	109,7 ^{ns}	104,3 ^{ns}	114,5 ^{ns}	109,1 ^{ns}	104,5 ^{ns}	114,9 ^{ns}	113,8 ^{ns}
	DF	93,9	103,8*	98,7 ^{ns}	93,2 ^{ns}	99,5 ^{ns}	97,6 ^{ns}	95,6 ^{ns}	96,5 ^{ns}	97,8 ^{ns}
	DV	98,8	108,7*	103,3 ^{ns}	98,1 ^{ns}	104,8 ^{ns}	102,5 ^{ns}	100,5 ^{ns}	101,3 ^{ns}	102,7 ^{ns}
	DC	155,1	153,0 ^{ns}	153,3 ^{ns}	152,1 ^{ns}	155,9 ^{ns}	154,4 ^{ns}	155,7 ^{ns}	156,6 ^{ns}	154,4 ^{ns}
	PNF	13,7	17,4*	16,0*	14,2 ^{ns}	16,7**	14,5 ^{ns}	14,8 ^{ns}	14,5 ^{ns}	15,4 ^{ns}
	NPV	13,8	17,4*	16,0*	14,2 ^{ns}	16,7**	14,6 ^{ns}	14,8 ^{ns}	14,6 ^{ns}	15,4 ^{ns}
	LV	6,89	5,56*	6,28 ^{ns}	6,89 ^{ns}	6,48 ^{ns}	6,57 ^{ns}	7,12 ^{ns}	6,53 ^{ns}	6,63 ^{ns}
	AV	1,22	1,03*	1,11*	1,26 ^{ns}	1,18 ^{ns}	1,18 ^{ns}	1,26 ^{ns}	1,17 ^{ns}	1,21 ^{ns}
	LH	3,83	3,62 ^{ns}	3,75 ^{ns}	4,13 ^{ns}	3,67 ^{ns}	3,71 ^{ns}	3,73 ^{ns}	4,16 ^{ns}	4,15 ^{ns}
	AH	2,18	1,92 ^{ns}	2,01 ^{ns}	2,36 ^{ns}	1,98 ^{ns}	2,02 ^{ns}	2,08 ^{ns}	2,38 ^{ns}	2,46 ^{ns}
	LE	6,47	5,93 ^{ns}	6,10 ^{ns}	6,48 ^{ns}	6,22 ^{ns}	6,25 ^{ns}	6,51 ^{ns}	6,54 ^{ns}	6,64 ^{ns}
	AE	3,63	3,14 ^{ns}	3,30 ^{ns}	3,63 ^{ns}	3,37 ^{ns}	3,47 ^{ns}	3,63 ^{ns}	3,67 ^{ns}	3,75 ^{ns}
	VP	1039	1279 ^{ns}	1200 ^{ns}	935 ^{ns}	1115 ^{ns}	1064 ^{ns}	1023 ^{ns}	1165 ^{ns}	1191 ^{ns}
	NG	3561	3877 ^{ns}	4006 ^{ns}	3162 ^{ns}	3395 ^{ns}	3532 ^{ns}	3431 ^{ns}	3872 ^{ns}	3843 ^{ns}
	DG	6,64	5,77 ^{ns}	6,15 ^{ns}	6,75 ^{ns}	6,42 ^{ns}	6,41 ^{ns}	6,83 ^{ns}	6,30 ^{ns}	6,40 ^{ns}
	PG	425	270*	391 ^{ns}	386 ^{ns}	346 ^{ns}	420 ^{ns}	455 ^{ns}	403 ^{ns}	381 ^{ns}
	[MD]		43,75	18,75	0	12,50	0	0	0	0
	MD%		15,65	8,17	3,98	8,11	3,66	2,96	5,25	6,81

b)

Variable	CA	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
<i>Varianza</i>									
AP	1827,8	1892,9 ^{ns}	1787,7 ^{ns}	1541,7 ^{ns}	1481,4 ^{ns}	1623,4 ^{ns}	1823,4 ^{ns}	2200,6 ^{ns}	2353,9 ^{ns}
DF	241,6	416,4 ^{ns}	317,6 ^{ns}	232,6 ^{ns}	390,5 ^{ns}	237,2 ^{ns}	164,9 ^{ns}	355,2 ^{ns}	621,3 ^{**}
DV	239,5	404,7 ^{ns}	309,1 ^{ns}	227,2 ^{ns}	366,5 ^{ns}	223,1 ^{ns}	163,1 ^{ns}	352,7 ^{ns}	616,8 ^{**}
DC	253,9	291,8 ^{ns}	248,0 ^{ns}	260,3 ^{ns}	311,2 ^{ns}	234,7 ^{ns}	168,2 ^{ns}	345,4 ^{ns}	423,7 ^{ns}
PNF	19,1	38,9 [*]	24,9 ^{ns}	16,6 ^{ns}	24,7 ^{ns}	16,5 ^{ns}	19,3 ^{ns}	24,2 ^{ns}	43,1 ^{**}
NPV	19,0	39,1 [*]	25,2 ^{ns}	16,6 ^{ns}	24,6 ^{ns}	16,3 ^{ns}	19,2 ^{ns}	24,0 ^{ns}	43,2 ^{**}
LV	1,91	3,90 [*]	3,25 [*]	2,24 ^{ns}	2,91 ^{ns}	2,36 ^{ns}	1,37 ^{ns}	2,42 ^{ns}	3,69 [*]
AV	0,05	0,11 [*]	0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,10 [*]
LH	3,17	2,97 ^{ns}	2,53 ^{ns}	2,47 ^{ns}	2,93 ^{ns}	2,86 ^{ns}	3,26 ^{ns}	2,43 ^{ns}	2,59 ^{ns}
AH	1,14	0,80 [*]	0,73 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,91 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,96 ^{ns}	1,05 ^{ns}
LE	1,66	3,65 [*]	2,28 ^{ns}	2,49 ^{ns}	1,95 ^{ns}	2,02 ^{ns}	1,74 ^{ns}	2,18 ^{ns}	2,85 ^{ns}
AE	0,78	1,02 ^{ns}	0,72 ^{ns}	1,19 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,86 ^{ns}	0,79 ^{ns}	1,05 ^{ns}	1,14 ^{ns}
VP	511692	1283877 ^{**}	800664 ^{ns}	507191 ^{ns}	726475 ^{ns}	484202 ^{ns}	498331 ^{ns}	635681 ^{ns}	989941 [*]
NG	4635787	8011172 ^{ns}	5605577 ^{ns}	3605112 ^{ns}	4034350 ^{ns}	3556423 ^{ns}	3110739 ^{ns}	5495219 ^{ns}	7373792 ^{ns}
DG	1,36	3,43 ^{**}	2,39 ^{ns}	1,71 ^{ns}	2,46 ^{ns}	1,85 ^{ns}	1,27 ^{ns}	1,88 ^{ns}	2,89 [*]
PG	54979	39100 ^{ns}	53617 ^{ns}	43478 ^{ns}	32994 ^{ns}	55429 ^{ns}	50217 ^{ns}	63474 ^{ns}	61329 ^{ns}
[VD]		50,00	6,25	0	0	0	0	0	50,00
VD%		39,85	24,61	17,50	29,48	14,78	18,41	20,11	45,81

c)

	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
CR%	82,22	85,96	89,19	79,45	89,57	82,55	98,95	95,76
VR%	130,26	109,99	102,41	107,98	105,22	92,67	108,61	132,31

NS: Diferencias no significativas

*: Diferencias significativas al 5% de probabilidad, $p < 0,05$ **: Diferencias significativas al 1% de probabilidad, $p < 0,01$

Por otra parte, los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver calculados a partir de las variables fenotípicas cualitativas para las distintas CCs, resultaron cercanos al de la CA (Tabla 2.7 y Figura 2.4). Las diferencias fueron no significativas ($p \leq 0,05$) para todos los valores

promedios estimados; con excepción a la colección E1F la cual fue significativamente diferente a la colección activa y a E2P.

Tabla 2.7. Comparación de los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver estimados a partir de las variables fenotípicas cualitativas. Valores con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

	CA	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
Sh-W (Fenotípico cualitativo)	2,174 ^b	2,122 ^a	2,149 ^{ab}	2,164 ^{ab}	2,156 ^{ab}	2,166 ^{ab}	2,173 ^b	2,157 ^{ab}	2,125 ^{ab}

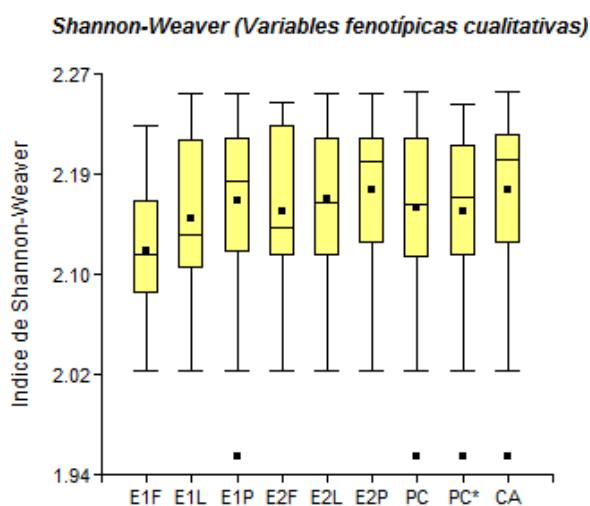


Figura 2.4. Diagramas de caja mostrando los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver entre las diferentes colecciones, considerando los datos fenotípicos cualitativos. Los puntos dentro de las “cajas” representan los valores medios indicados en la tabla 2.7.

Con respecto a la variable color de flor (CF), la colección E2P no mostró la categoría salmón, puesto que no incluyó ninguna accesión de la especie *P. fulvum*. También, en esta colección no se encontraron accesiones con los bordes de hoja (BH) levemente aserrados.

Las colecciones E1P, PC y PC*, a diferencia del resto de las CCs, incluyen la única accesión (cod 120) que presentó 7 pares de folíolos en sus hojas. A esto último se debe el valor atípico del Índice de Shannon-Weaver de 1,95, que se observa en el gráfico de cajas (Figura 2.4 a) tanto en la CA como en las colecciones núcleo E1P, PC y PC*.

La colección que presentó el valor más cercano a la CA del índice de Diversidad de Shannon-Weaver fue E2P, con un valor de 2,173 en lugar de 2,174. Además, el diagrama de cajas entre estas dos colecciones es muy similar, salvo por el valor atípico mencionado anteriormente.

3.2.2. Evaluación de las colecciones núcleo a nivel molecular

Las estimaciones de los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver de la colección inicial y las distintas CCs, obtenidos utilizando la información de ambos marcadores moleculares, no evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (Tabla 2.8; Figura 2.5).

La colecciones PC y PC* fueron las que más se acercaron al valor máximo de dicho Índice de diversidad de la CA. Sin embargo, si bien el diagrama de cajas entre las colecciones PC y CA fue equivalente, no se observó lo mismo entre PC* y CA (Figura 2.5).

Tabla 2.8. Comparación de los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver entre las diferentes colecciones. Valores con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

	CA	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
Sh-W (SRAP-SSR)	4,717 ^a	4,677 ^a	4,696 ^a	4,702 ^a	4,700 ^a	4,693 ^a	4,709 ^a	4,713 ^a	4,713 ^a

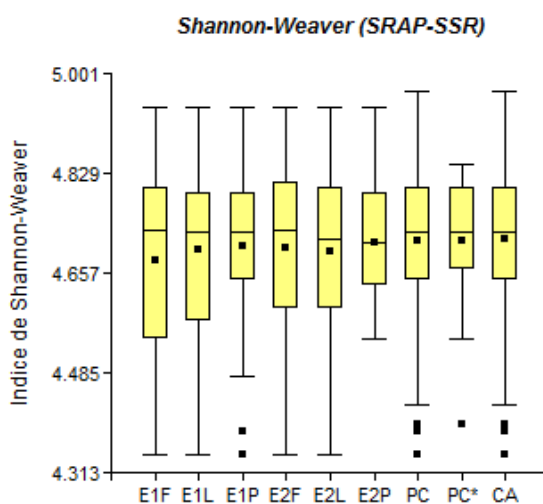


Figura 2.5. Diagramas de caja mostrando los Índices de Diversidad de Shannon-Weaver entre las diferentes colecciones, considerando los datos moleculares. Los puntos dentro de las “cajas” representan los valores medios indicados en la tabla 2.8.

Por otro lado, considerando cada tipo de marcador molecular por separado, se pueden observar en la Tabla 2.9 la comparación de diferentes medidas de variabilidad genética para las distintas colecciones, y sus gráficos correspondientes en la Figura 2.6.

Tabla 2.9. Comparación de medidas de variabilidad genética entre las diferentes colecciones a partir de la información molecular. H= Diversidad Genética; PIC= Contenido de Información Polimórfica; A = número de alelos promedio; A_e= número de Alelos Efectivos; P%= nivel de Polimorfismo. Valores con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

	CA	E1F	E1L	E1P	E2F	E2L	E2P	PC	PC*
H (SSR)	0,826 ^a	0,639 ^f	0,741 ^{cd}	0,765 ^{bc}	0,695 ^{ef}	0,783 ^{ab}	0,780 ^b	0,773 ^{bc}	0,717 ^{de}
H (SRAP)	0,404 ^a	0,401 ^a	0,404 ^a	0,402 ^a	0,403 ^a	0,402 ^a	0,402 ^a	0,405 ^a	0,405 ^a
PIC (SSR)	0,807 ^a	0,578 ^e	0,699 ^c	0,733 ^b	0,642 ^{de}	0,751 ^{ab}	0,747 ^b	0,745 ^b	0,672 ^{cd}
PIC (SRAP)	0,322 ^a	0,319 ^a	0,322 ^a	0,321 ^a	0,321 ^a	0,320 ^a	0,321 ^a	0,323 ^a	0,323 ^a
A (SSR)	9,00 ^a	4,13 ^d	5,38 ^c	6,13 ^b	4,38 ^d	6,38 ^b	6,13 ^b	6,50 ^b	5,25 ^c
A_e (SSR)	6,38 ^a	2,84 ^f	3,97 ^{cd}	4,36 ^{bc}	3,43 ^{ef}	4,88 ^{ab}	4,75 ^b	4,62 ^{bc}	3,70 ^{de}
%P (SRAP)	96,69	77,90	83,98	82,60	78,73	85,91	77,90	96,69	79,01

Para el caso de los marcadores SRAP, no se encontraron diferencias significativas al 5% entre las distintas colecciones en cuanto a la Diversidad Genética H (Tabla 2.9). En cambio, esta misma medida de variabilidad H para los microsatélites, mostró diferencias significativas entre la colección activa y todas las colecciones núcleo, con excepción a E2L. Es decir, la colección núcleo E2L mostró ser la más apropiada según el estimador H de diversidad a partir de los SSR.

El Contenido de Información Polimórfica (PIC), no evidenció diferencias significativas entre todas colecciones para el caso de los marcadores SRAP. Por lo contrario, con los microsatélites, solo la colección núcleo E2L mostró diferencias no significativas con la CA.

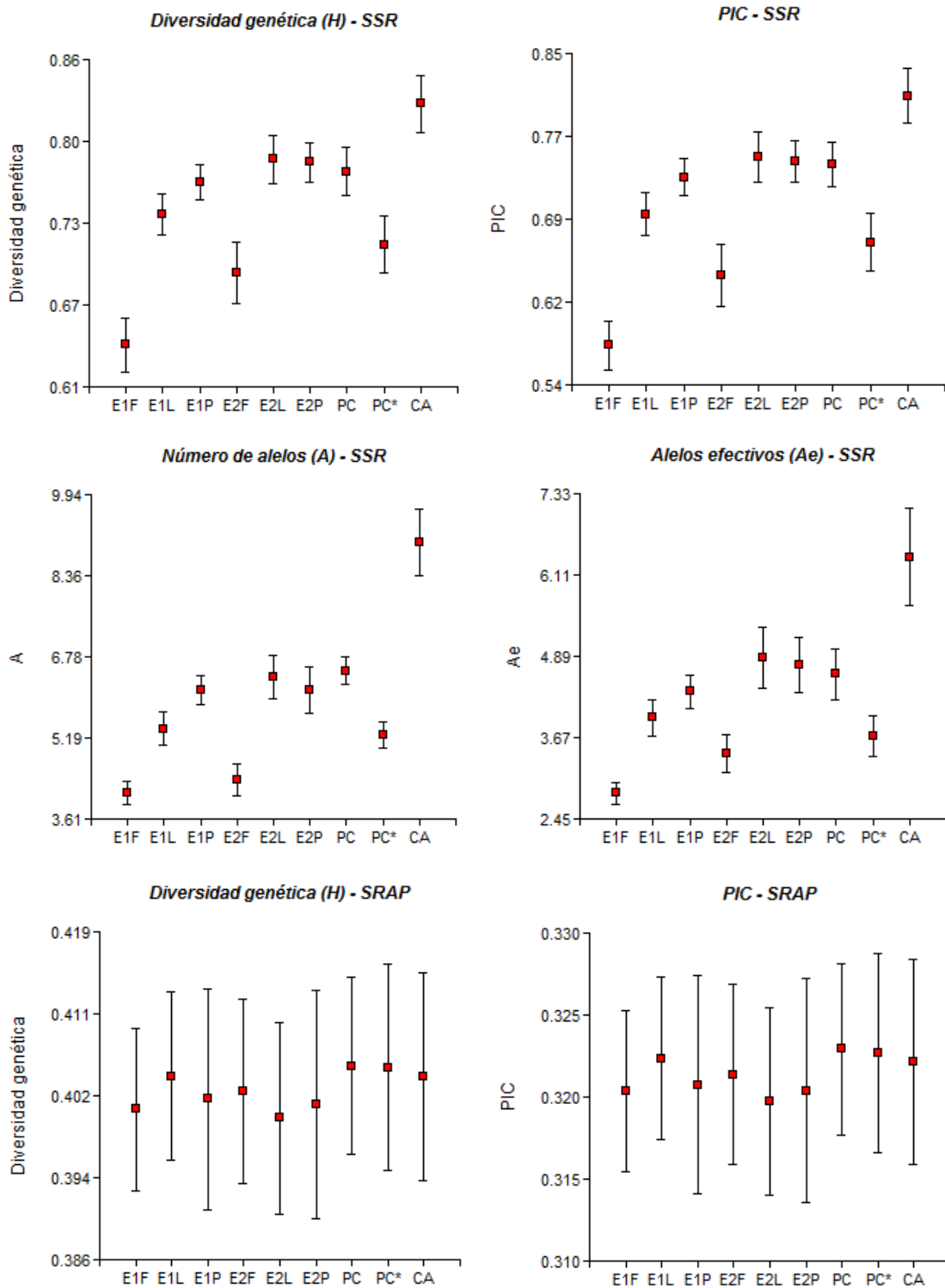


Figura 2.6. Promedios (\pm EE) de las medidas de variabilidad: Diversidad Genética, PIC, número de alelos promedio y número de alelos efectivos; por colección para los marcadores moleculares.

El número de alelos efectivos (A_e) obtenido para los microsatélites, no mostró diferencias significativas entre las colecciones E2L y CA (Tabla 2.9). El resto de las CCs evidenciaron diferencias significativas con respecto a la CA para dicha medida de variabilidad. Para el caso del número de alelos promedio (A), todas las CCs fueron diferentes significativamente a la CA.

Con respecto al nivel de polimorfismo (%P) calculado a partir de los marcadores SRAP, se observó una disminución en todas las CC con excepción a la colección PC. De las seis CC que menguaron su polimorfismo, la que presentó un valor de %P más cercano a la colección original fue E2L (85,91%).

3.2.3. Evaluación de las colecciones núcleo definitiva a nivel fenotípico y molecular

Luego del proceso de validación de las CCs a nivel morfológico y molecular por separado, se observó que la colección núcleo E2L, constituida por 34 accesiones, resultó ser la colección más representativa.

La colección núcleo PC obtenida utilizando el programa PowerCore también mostró preservar la diversidad genética de la colección original; pero esta presentó un tamaño mucho mayor al definido como óptimo.

En la configuración de consenso obtenida del APG realizado en el Capítulo 1 (Resultados, Sección 3.3.1.), la distribución espacial de las entradas de la colección E2L resultó bastante balanceada con respecto a la distribución espacial de las accesiones de la colección entera o activa (Figura 2.7). Además, se observó un incremento en la proporción de las accesiones con genotipos y fenotipos extremos; los cuales estuvieron presentes en gran medida en las taxa diferentes a *P. sativum* ssp *sativum* var. *sativum*.

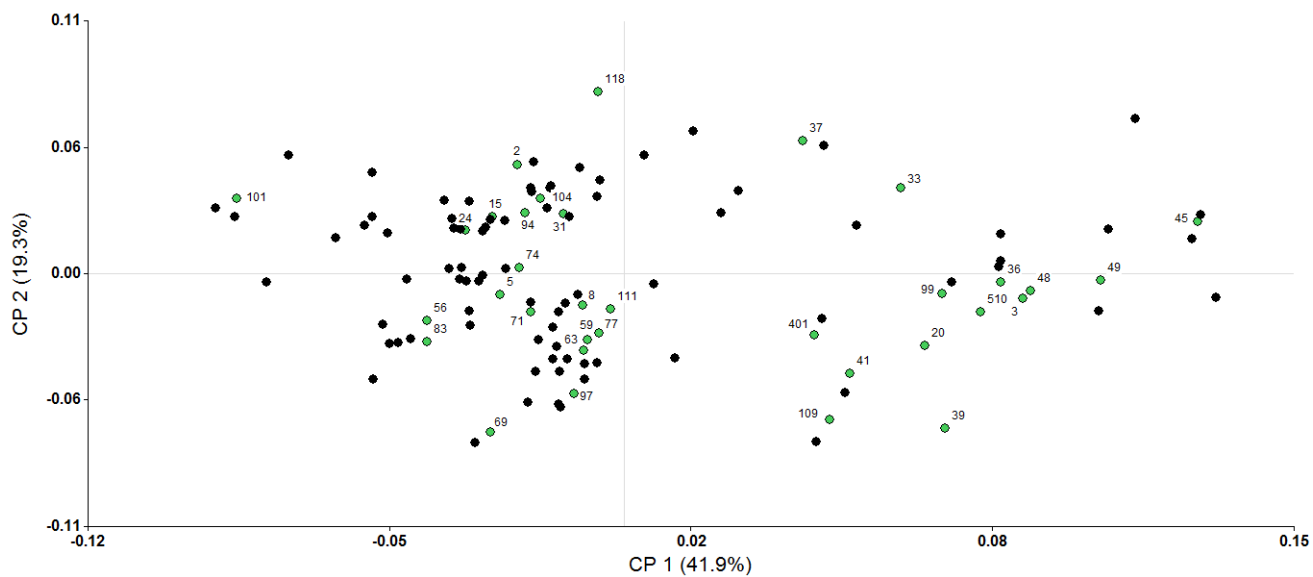


Figura 2.6. Comparación de la configuración de consenso de las accesiones de *Pisum* de la colección activa (“puntos negros” + “puntos verdes” en el gráfico) y de la colección núcleo E2L (“puntos verdes” en el gráfico).

DISCUSIÓN

Los recursos fitogenéticos comprenden la amplia diversidad genética de los organismos del mundo vegetal, e incluye la variabilidad tanto entre especies como dentro de una misma especie. Los recursos genéticos vegetales representan una garantía para la seguridad alimentaria del planeta (FAO, 2010); puesto que son la materia prima de la que dependen los fitomejoradores y agricultores para desarrollar variedades mejoradas, y para hacer frente a situaciones imprevistas como alteraciones climáticas y necesidades de desarrollo humano.

Si bien los adelantos más importantes conseguidos por los países desarrollados y los países en desarrollo en materia de productividad agrícola han dependido, en gran medida, del acceso a una amplia variedad de recursos filogenéticos; una serie de factores amenazan la biodiversidad. La causa principal de la pérdida de diversidad genética o del proceso de erosión genética, de acuerdo con el *Estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo* de la FAO (FAO, 2010), es la sustitución de las variedades locales por variedades modernas. Además, el incremento del monocultivo industrial en la agricultura conduce a una pérdida de diversidad. Con frecuencia el gran número de variedades existentes se reduce cuando se introducen variedades comerciales en los sistemas de cultivo tradicionales. Otras causas de la erosión genética incluyen el surgimiento de nuevas plagas y enfermedades, y la degradación del hábitat, producto de la deforestación y la urbanización.

Ante lo expuesto, las actividades relacionadas con la conservación de los recursos fitogenéticos, así como las diferentes estrategias para conservar el germoplasma, permiten contrarrestar el proceso de erosión genética.

La recolección de germoplasma es la etapa inicial en relación a la conservación y el estudio de los recursos genéticos. No obstante, la obtención de germoplasma posee un valor limitado si no se articula con una adecuada caracterización y evaluación. La caracterización se refiere a la descripción de la variación existente en una colección de germoplasma mediante el uso de características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad; es decir características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente (van Hintum, 1995). La evaluación implica la descripción de la variación existente en una colección para atributos de importancia agronómica con alta influencia del ambiente, tal como ocurre para la mayoría de los caracteres

cuantitativos. El objetivo principal de la caracterización es la identificación de las accesiones, mientras que el de la evaluación es conocer el valor agronómico de los materiales.

A su vez, la variabilidad contenida en el genoma de una especie puede ser agrupada en dos grandes clases: (1) la que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo, y (2) la que no se expresa en características visibles y que en general se refiere a los procesos o productos internos de la planta (Franco y Hidalgo, 2003). De este modo, la caracterización se puede realizar a dos niveles: agromorfológico y molecular; teniendo como fin la medición de la variabilidad genética de las colecciones de germoplasma.

Tradicionalmente la comunidad científica ha enfatizado el problema de la falta de caracterización de las colecciones de germoplasma (Frankel y Brown, 1984). Existe una considerable brecha entre el número de materiales conservados y el de aquellos de los que se tienen datos de caracterización y evaluación, estimándose a nivel mundial un 80% de muestras sin datos de caracterización y un 95% sin datos de evaluación agronómica (Peeters y Galgway, 1988). La colecta y conservación de recursos fitogenéticos sin que esté acompañada de la información sobre sus características convierte a las colecciones en simples depósitos de materiales, sin mayor utilidad.

Con respecto al primer nivel de caracterización, en el presente trabajo una colección del género *Pisum* constituida por 126 accesiones fue caracterizada y evaluada por medio de descriptores morfológicos, fenológicos y productivos. Estos descriptores fenotípicos resultaron de gran utilidad para estudiar la diversidad genética disponible en la colección; ya que implicaron procesos de medición simples y de observación directa, y tuvieron una alta acción discriminante. Sin embargo, en algunos, su desventaja principal radicó en la influencia ambiental sobre su expresión. Los valores observados en los genotipos para los descriptores cuantitativos son afectados por el ambiente. Además, las características fenológicas y, principalmente, las productivas están sometidas a interacciones entre el genotipo y el medio ambiente (van Hinthum, 1995; Abadie, 2001).

La interacción genotipo por ambiente (GxA) es una respuesta diferencial de los genotipos a través de las condiciones ambientales cambiantes; y resulta de gran importancia para los fitomejoradores (Moll y Stuber, 1974; Yang y Baker, 1991). El estudio de la interacción GxA es un tema de relevancia en el mejoramiento genético, siendo uno de los factores determinantes en la selección y recomendación de cultivares evaluados, debido a que los

patrones de respuesta de los cultivares no son uniformes a través de los diversos ambientes donde se evalúan. La evaluación de cultivares en diferentes ambientes permite recomendar a aquéllos que se comporten mejor en la mayor cantidad de ambientes analizados. Los cambios en el ordenamiento de los cultivares al cambiar de ambiente indican la presencia de interacción GxA y la ausencia de estabilidad para el carácter en cuestión.

De este modo, para poder evaluar el efecto del genotipo, primeramente se debe estudiar la influencia del ambiente y de la interacción genotipo por ambiente en la expresión de los caracteres. En este trabajo, se analizó el efecto ambiente, realizando evaluaciones en diferentes años, y la interacción genotipo por ambiente (accesión x año); con la finalidad de caracterizar los recursos genéticos disponibles de *Pisum* de una forma más certera, al tratar de capturar el efecto del genotipo *per se*. Por medio del Análisis de Variancia se detectó la existencia de efectos significativos ($p < 0,05$ ó $p < 0,01$) y altamente significativos ($p < 0,001$), para las fuentes de variación ambiente e interacción accesión x ambiente, para muchas de las variables cuantitativas evaluadas (Tabla 1.5 y Tabla 1.6). Además, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las accesiones para los dieciséis descriptores cuantitativos.

Cabe aclarar que nuestra colección de germoplasma de *Pisum* es dinámica, pues se han ido incorporando nuevas accesiones; por lo tanto, no todas las accesiones han sido evaluadas en el mismo año y/o ambiente. De los tres años analizados (2011, 2012 y 2013), el año 2012 correspondió al ensayo con el mayor número de accesiones, evaluándose toda la colección de trabajo. Según los informes presentados en conjunto por la Bolsa de Comercio de Santa Fe, la Universidad Católica de Santa Fe y el Ministerio de la Producción, sobre las Estimaciones Agrícolas de la Provincia de Santa Fe, la campaña agrícola 2012 estuvo fuertemente impactada por las condiciones climáticas. Estos informes manifestaron que: “La sequía de fin de 2011 y principios de 2012 perjudicó a la campaña gruesa. Luego, el fenómeno climático El Niño y las heladas a destiempo, provocaron mermas en los rendimientos en trigo y cebada. Asimismo, los sembradíos de garbanzos y arvejas se perdieron en forma total”.

Por su parte, Andriani (2012) declaró que de los cultivos de invierno, durante el año 2012, los más afectados fueron las legumbres. Esto último se debió, en parte, por la gran expansión del área de siembra de estos cultivos en la provincia de Santa Fe. Además, por las propias enfermedades que resultaron favorecidas por las condiciones de humedad. Del mismo modo, en nuestro ensayo a campo realizado durante el 2012 en la localidad de Zavalla, se

detectó una disminución en los valores obtenidos para los caracteres productivos número de vainas, número de granos y peso de grano seco por parcela en las accesiones de la colección, con respecto a los años 2011 y 2013

En Argentina, Espósito *et al.* (2007b; 2009) estudiaron en arveja la interacción genotipo por ambiente, al comparar quince caracteres cuantitativos morfológicos en dos años disímiles, en cuanto a condiciones de temperatura, precipitaciones y aporte de nutriente. Los autores encontraron que la interacción GxA fue significativa ($p < 0,01$) para todos los caracteres, con excepción al número de nudos a la primera flor y a la primera vaina. Para estos dos últimos descriptores, en el presente estudio, el efecto de interacción GxA también fue no significativo en el conjunto de 28 accesiones (Tabla 1.6). Sin embargo, el efecto de GxA fue significativo ($p < 0,05$) para estas mismas dos variables en el conjunto de 98 accesiones (Tabla 1.5).

Los resultados de estos Análisis de Variancia combinados, sumado a las diferencias significativas ($p < 0,01$) observadas entre las accesiones de la colección para todos los descriptores cuantitativos evaluados en cada año (Tablas 1.4), sugiere la existencia de una gran variabilidad genética en la colección de recursos fitogenéticos de *Pisum*. Este último es de gran importancia al considerar que en nuestro país, si bien existen más de 56 variedades inscriptas en el INASE (Instituto Nacional de Semillas), sólo 2 o 3 variedades comerciales con una antigüedad mayor a quince años, dominan el mercado. La conservación de una colección con una alta variabilidad genética, podría permitir afrontar la mayor vulnerabilidad a plagas y enfermedades, y los problemas de calidad asociados con la uniformidad genética del cultivo.

En nuestro país los trabajos sobre caracterización y evaluación de arveja, principalmente a nivel molecular, son escasos y necesarios. Como se mencionó previamente, la caracterización se puede realizar a dos niveles: agromorfológico y molecular. Con respecto a este segundo nivel, el estudio de la variabilidad no expresada en características visibles en la planta se concentra en la detección de marcadores moleculares, tales como los fragmentos de ADN. En este trabajo, la diversidad genética disponible en la colección del género *Pisum* fue analizada basándose en técnicas moleculares y estimando diferentes medidas de variabilidad genética a partir de la información brindada por los marcadores moleculares SSR y SRAP.

Con respecto a los marcadores codominantes microsatélites, en la presente tesis se utilizaron 15 SSR; los cuales presentaron un patrón de bandas claro y reproducible. Estos SSR se distribuyeron a lo largo del genoma de arveja; lo que permitió una evaluación más global.

Pisum tiene siete grupos de ligamiento y cada grupo de ligamiento presentó entre dos y tres SSR (Tabla 1.13); con excepción del grupo de ligamiento III, cuyos microsatélites probados no dieron productos de calidad o un patrón de bandas claro.

El número de alelos promedio (A) detectado por medio de los microsatélites, fue de 8,4, con un mínimo de 5 y un máximo de 11 alelos por locus (Tabla 1.13). Burstin *et al.* (2001) y Loridon *et al.* (2005) desarrollaron y evaluaron el nivel de polimorfismo de 257 microsatélites en un set de 8 genotipos de arveja, entre los cuales se encontraron los 15 SSR utilizados en nuestro trabajo. Para estos 15 SSR, Loridon *et al.* (2005) detectaron un número de alelos por locus (A) que varió entre 3 y 7 según el marcador. Al comparar el grado de polimorfismo detectado por este conjunto de microsatélites, el mismo fue considerablemente mayor en nuestra colección de *Pisum*; ya que el número de alelos por locus fue altamente superior. Una causa de esta notoria diferencia puede haber sido el número de genotipos evaluados. Nuestra colección de germoplasma presenta un tamaño mayor comparado con los 8 materiales de arveja utilizado por los autores mencionados. Además, esos 8 genotipos correspondieron a la ssp. *sativum*, y nuestra colección incluyó otras subespecies, y principalmente, otras especies del género.

Cabe aclarar que en la determinación del número de alelos, la existencia de homoplasia, es decir, la obtención de productos de PCR de igual tamaño que son considerados como un mismo alelo pero que en realidad no son idénticos; no puede ser excluida. Esto se debe a la utilización de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para la separación de los productos de PCR. Así, la medida de variabilidad A, inclusive, podría ser mayor en la colección de trabajo. La homoplasia, la cual es producto de cambios en la estructura de los fragmentos, presencia de inserciones o deleciones, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante; podría ser descartada por medio de un análisis de secuenciación de los alelos obtenidos (Gugerli *et al.* 2008; Lia *et al.* 2007).

Por otra parte, el índice de Diversidad Genética (H) promedio de todos los loci es una estimación del grado de variabilidad genética en la colección, y varía de 0 a 1. En nuestra colección de trabajo el valor promedio de este estimador obtenido a partir del análisis con SSR fue alto ($H=0,842$), indicando una elevada variabilidad genética en la misma. Smýkal *et al.* (2008b) reportaron un valor promedio de H de 0,63 para una colección de 164 accesiones de *P. sativum* ssp. *sativum*, caracterizada por medio de diez microsatélites, de los cuales dos SSR

(A9 y AB23) son comunes a los utilizados en este trabajo. Sin embargo, comparar el nivel de diversidad genética entre diferentes estudios a partir de este índice de diversidad resulta dificultoso. Esto último es debido a que el parámetro H depende del número de accesiones analizadas y de la cantidad de microsatélites utilizados. Igualmente, el valor elevado obtenido de la Diversidad Genética, podría ser debido a que nuestra colección incluyó, además de *P. sativum*, las especies *P. fulvum* y *P. abyssinicum*; y distintas subespecies dentro de *P. sativum*.

El análisis molecular con los 15 SSR, mostró que gran parte de los recursos genéticos disponibles de *Pisum* presentaron un único alelo en cada accesión para cada SSR. Y, justamente, el índice de Diversidad Genética (H) es apropiado para medir la variabilidad genética en colecciones donde hay muy pocos materiales heterocigotas, pero muchos tipos diferentes de alelos que se encuentran en homocigosis (Balzarini *et al.*, 2010). No obstante, se detectaron accesiones que presentaron más de un alelo por locus; tales como: 1-826a (cod 48) y Plevan2 (cod 49) de la var. *arvense*, Vir 3115 (cod 38) y Vir 2524b (cod 511) de la ssp. *elatius*, Vir K-4871 (cod 44) de la ssp. *transcaucasicum*, dos accesiones Ilca (cod 32 y 34), y Wonder Marrowfat (cod 8), Inca (cod 54), ErikII (cod 74) y EI (cod 85) de la var. *sativum*.

Igualmente, la presencia de más de un alelo por locus, probablemente esté asociada a la heterogeneidad dentro de la accesión, más que a la existencia de plantas heterocigotas. Esto se basa en que el género *Pisum* está formado, en general, por plantas autógamias con un alto grado de autopolinización. Además, las extracciones de ADN se realizaron sobre hojas de cinco plantas por accesión; lo que puede llevar a detectar variabilidad molecular dentro de la accesión. Asimismo, algunas de las accesiones que presentaron más de un alelo por locus, tales como 1-826a, Vir 2524 y Vir K-4871, mostraron a nivel fenotípico distintos morfotipos. Por ejemplo, en la accesión Vir 3115 se observaron plantas con granos moteados, plantas con granos moteados y veteados; y plantas sin motes y vetas en sus granos. Además, esta accesión presentó variantes en el borde de sus folíolos (lisos o aserrados). Por último, Cieslarová *et al.* (2011) detectaron variación dentro de accesiones de var. *sativum* y var. *arvense*; y Smýkal *et al.* (2008b) manifestaron que los cultivares primitivos y variedades locales tradicionales son frecuentemente poblaciones heterogéneas de varios genotipos.

Además del Índice de Diversidad Genética, otro parámetro de variabilidad determinado molecularmente, fue el contenido de información polimórfico (PIC); el cual permite evaluar la utilidad de un marcador molecular para distinguir entre las accesiones analizadas (Posso,

2012). En el caso de los marcadores codominantes, los valores de PIC oscilan entre 0 y 1 (Shete *et al.*, 2000); tendiendo a un valor de 0 cuando no existe variación alélica. En el presente estudio los 15 microsatélites presentaron valores de PIC cercanos a 1, con un valor promedio de 0,824; lo cual indicó que los SSR utilizados fueron altamente informativos y eficientes para detectar polimorfismo en la colección (Botstein *et al.*, 1980). Loidon *et al.* (2005) detectó un valor promedio de PIC menor (PIC= 0,762) para este mismo grupo de SSR en un conjunto de ocho genotipos de arveja. Otros estudios de caracterización de arveja por medio de microsatélites, reportaron valores promedios de PIC de 0,521 (Smýkal *et al.*, 2008a), 0,62 (Bouhadida *et al.*, 2013) y 0,627 (Ahmad *et al.*, 2015). De este modo, este resultado reafirma la gran variabilidad genética existente en la colección de *Pisum*.

Para el caso de los marcadores dominantes, los valores esperados de PIC oscilan entre 0 y 0,5; ya que se asume la presencia de dos alelos por locus y el contenido de información polimórfico es influenciado por el número y la frecuencia de los alelos (Henry 1997; De Riek *et al.* 2001; Bolaric *et al.* 2005). En esta tesis se utilizaron diez combinaciones de marcadores SRAP, las cuales fueron altamente informativas ya que presentaron valores de PIC mayores a 0,3 (Tabla 1.14). Si bien no se han reportado valores de PIC en los estudios existentes en *P. sativum* utilizando marcadores SRAP, los valores altos de PIC obtenidos en este trabajo confirman la utilidad de este tipo de marcadores en la identificación y caracterización de la especie.

Por otro lado, en nuestra colección de *Pisum*, encontramos 361 bandas polimórficas con un promedio mayor a 37 bandas por combinación de cebadores SRAP. Espósito *et al.* (2007a) caracterizaron 40 accesiones de *P. sativum* ssp. *sativum* var. *sativum* por medio de siete combinaciones de marcadores SRAP; y reportaron un total de 162 bandas polimórficas con un promedio de 23 bandas por combinación. Al comparar estos dos resultados, si bien el número de accesiones del presente trabajo fue mucho mayor y se utilizaron más combinaciones de cebadores, la notoria diferencia en el número de bandas puede estar asociada a la gran diversidad genética existente.

Si bien los dos tipos de marcadores SRAP y SSR resultaron técnicas moleculares muy útiles para estimar la variabilidad genética en nuestra colección de *Pisum*, la correlación entre SSR y SRAP considerando las distancias genéticas entre las accesiones fue muy débil ($r=0,26$, $p<0,001$). Esta pequeña correlación probablemente se debió al tipo de polimorfismo que detecta

cada clase de marcador. Los marcadores codominantes microsatélites se basan en secuencias no codificantes de motivos básicos de nucleótidos que se repiten en tándem; donde cada secuencia de SSR se define por el tipo de unidad repetida y por el sitio que ocupan en el genoma. Los SSR son secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta generalmente como diferencias en la longitud entre los distintos alelos del mismo locus (González, 2003). En cambio, los marcadores dominantes SRAP, amplifican marcos abiertos de lectura (ORFs) y no son específicos de la especie, en el sentido de que los cebadores se pueden utilizar independientemente de la especie vegetal en estudio (Aneja *et al.*, 2012). Sin embargo, la correlación encontrada entre SSR y SRAP a nivel de los distintos grupos taxonómicos de *Pisum* fue elevada ($r=0,78$, $p<0,001$). Así, los dos tipos de marcadores proporcionaron estimaciones semejantes de las relaciones genéticas entre las diferentes taxa de *Pisum* para las accesiones disponibles del género. De este modo, el uso en forma conjunta de diferentes tipos de marcadores, puede producir una estimación de la diversidad genética más informativa que la utilización individual de los mismos (Baranger *et al.* 2004; Simioniuc *et al.* 2002); ya que la información brindada por cada clase de marcador es diferente y se complementa.

Con respecto a la taxonomía de *Pisum*, si bien es un tema que escapa a los objetivos principales de esta tesis, la caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos permitió realizar una aproximación a la clasificación del género; pues proporcionó información acerca de las relaciones genéticas entre las accesiones de la colección de *Pisum*. Hasta el momento, la clasificación del género *Pisum* es controvertida y confusa; y requiere ser estudiada para poder incrementar la eficiencia de la gestión y conservación del germoplasma.

En relación a esto, el Análisis de Conglomerados permite identificar la estructura subyacente de una colección, agrupando a las accesiones en estudio en grupos (o *clusters*) relativamente homogéneos o similares en base a las variables analizadas (Balzarini *et al.*, 2010). Luego, una forma de validar los resultados obtenidos en el Análisis de Conglomerado es por medio del coeficiente de correlación cofenético, el cual surge al comparar la matriz cofenética y la matriz de distancias original (Cuadras, 2012). Una alta correlación entre matrices, con valores de coeficiente de correlación cofenético mayores o iguales a 0,8, será señal de poca distorsión. En la presente tesis los valores obtenidos de correlación cofenética fueron altos; lo cual indicó que las relaciones implícitas en la matriz de distancias fueron reflejadas con fidelidad.

Los análisis de agrupamiento UPGMA realizados a partir de los marcadores moleculares SSR y SRAP, permitieron distinguir a *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum*, formando tres grupos claramente separados (Figuras 1.14 y 1.16). Este resultado está en concordancia con previos estudios donde se manifestó que *P. abyssinicum* es un tipo de material derivado independientemente (Vershinin *et al.* 2003; Tar'an *et al.* 2005; Jing *et al.* 2010; Jing *et al.* 2012). Asimismo, en el análisis de agrupamiento considerando en forma conjunta los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos, las accesiones de *P. abyssinicum* mostraron ser más similares a las formas silvestres de *P. fulvum* que a las accesiones de *P. sativum*; ya que *P. abyssinicum* y *P. fulvum* formaron un subgrupo en el dendrograma (Figura 1.9). Estas últimas dos especies, por ejemplo, presentaron ambas folíolos con bordes aserrados o ligeramente aserrados, un único par de folíolos, estípulas no abrazadoras, flores coloreadas y granos de superficie lisa. Además, mostraron menor tamaño de estípulas, folíolos, vainas y granos en comparación a *P. sativum*.

Por otro lado, en relación a *P. fulvum*, en los análisis de agrupamiento moleculares se observó una notoria separación de esta especie con respecto a las demás taxa del género *Pisum*. Esto principalmente se manifestó en el árbol obtenido con el método de *Neighbor-joining* (Figura 1.15), donde la longitud de las ramas directamente refleja la distancia genética entre las accesiones. Si bien el número de accesiones de *P. fulvum* en la colección es bajo, los resultados de la tesis concuerdan con lo esperado de reconocer a *P. fulvum* como una especie en forma inequívoca, la cual está completamente aislada de *P. sativum* (Kosterin y Bogdanova 2008).

En la literatura publicada hasta el momento sobre la taxonomía del género *Pisum*, se encuentra cierto acuerdo sobre el número de taxa del género; pero existe una gran disputa en relación al rango o categoría de cada taxón. Las inter-relaciones y posiciones taxonómicas fueron clarificadas parcialmente por Ben-Ze'ev y Zohary (1973). Ellos encontraron que al cruzar las posibles especies *P. sativum*, *P. elatius*, *P. humile* y *P. fulvum*, las tres primeras fueron completamente interfértiles y solo *P. fulvum* fue más aislada. Por lo tanto, esta última merecía una específica distinción de *P. sativum*. La clasificación propuesta por Davis (1970), la cual reconoce dos especies (*P. sativum* y *P. fulvum*), y varias subespecies de *P. sativum*, ha sido adoptada por diversos autores. Sin embargo, Davis no incluyó en su clasificación los taxa encontrados por fuera del Medio Oriente. Este es el caso, por ejemplo, del taxón *P. abyssinicum* A. Br. de Etiopia principalmente. El taxón *abyssinicum*, probablemente, corresponde a la

categoría de especie; lo cual es soportado por diversas evidencias (Kloz, 1971; Ellis *et al.*, 1998; Jing *et al.*, 2010; Smýkal *et al.*, 2011; Upadhyaya *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2015). Asimismo, los resultados de esta tesis concuerdan con la idea de considerar al taxón *abyssinicum* como una especie del género *Pisum*.

Con respecto al taxón *elatius*, las accesiones presentaron una asociación parcial; porque si bien algunas accesiones se agruparon, como se evidenció en el árbol molecular (Figura 1.15) otras accesiones aparecieron dispersas y relacionadas a distintas taxa. Esto último claramente se observó en el análisis considerando en forma conjunta la información morfológica y molecular (Figuras 1.18, 1.19 y 2.2). En un previo análisis de agrupamiento, basado en marcadores RIBP (Martin-Sanz *et al.*, 2011), las muestras de *P. elatius* también se ubicaron dispersas entre los distintos grupos de taxa de *Pisum*. Estos resultados evidenciaron la gran variación morfológica y molecular que existe para las formas silvestres del taxón *elatius*.

La subespecie *jomardii* mostró estar asociada a algunas accesiones de la ssp. *elatius* y a la variedad botánica *arvense* en la caracterización fenotípica (Figura 1.9). Sin embargo, en el dendrograma de los grupos taxonómicos basado en los marcadores SSR (Figura 1.16), esta ssp. *jomardii* se ubicó junto a *P. abyssinicum*. Igualmente, se debe considerar que la representación de la ssp. *jomardii* en la colección de *Pisum*, en cuanto a la cantidad de accesiones, fue demasiado baja como para obtener conclusiones firmes. El taxón *jomardii* no ha sido incluido, prácticamente, en estudios moleculares; y es, comúnmente, considerado como una subespecie de *P. sativum*.

En relación a las variedades botánicas de *P. sativum*, nuestra colección de trabajo presenta accesiones de las var. *sativum*, var. *macrocarpon* y var. *arvense*. En los análisis de agrupamiento considerando solamente los datos fenotípicos, las variedades *sativum* y *macrocarpon* se observaron estrechamente asociadas entre sí y separadas de la var. *arvense* o arveja forrajera (Figura 1.9). Al incluir en el análisis de conglomerados los datos moleculares se encontraron las mismas relaciones genéticas entre las tres variedades botánicas (Figura 1.17 y 1.18). Estos resultados concuerdan con los resultados publicados por Nasiri *et al.* (2009), quienes analizaron los patrones de diversidad entre accesiones de *Pisum* por medio de SSR y encontraron que la var. *sativum* y la var. *arvense* formaron grupos separados en el análisis de conglomerados.

De esta manera, el presente trabajo suministró adicional información para comprender las relaciones genéticas entre las distintas unidades taxonómicas del género *Pisum*. La producción de una clasificación taxonómica estable y congruente de *Pisum*, ayudará a la conservación y el uso apropiado de los recursos genéticos de este género. Igualmente, futuras evaluaciones incrementando el número de accesiones de *P. fulvum*, *P. abyssinicum*, *P. sativum* ssp. *jomardii* y *P. sativum* ssp. *elatius*, permitiría verificar los patrones de relaciones genéticas encontrados. Además, la incorporación de accesiones pertenecientes a las taxa de *Pisum* que hasta el momento no están representados en la colección activa, tales como la subespecie *asiaticum* y las variedades botánicas *choresmicum*, *ponderosum*, *tibeticum*, *brevipedunculatus* de *P. sativum*; llevará a un análisis taxonómico más completo e integral. Por otro lado, el incluir un número mayor de muestras de *P. fulvum* y *P. abyssinicum*, puede ayudar a eliminar el efecto de “encadenamiento” observado en el análisis de agrupamiento de las accesiones individuales a partir de ambos marcadores SSR y SRAP (Figura 1.14) Por efecto de “encadenamiento” se hace referencia a la incorporación sucesiva (una por vez) de cada accesión en el dendrograma.

Además del análisis de Conglomerados, otra técnica de ordenación que permitió estudiar los recursos genéticos de *Pisum* utilizando toda la información proveniente de la caracterización morfológica y molecular, fue el análisis de Procrustes Generalizado (APG). El APG propuesto por Gower (1975), es una técnica utilizada para determinar las relaciones entre observaciones de datos de distinto tipo. El APG permite obtener el consenso entre matrices de diferente naturaleza hasta obtener una configuración única. La cuantificación del consenso provee información sobre la adecuación de una configuración producida por cada conjunto de variables (morfológicas o moleculares) en un fondo genético (Gower, 1975). Este análisis reveló un consenso elevado (77,6%) entre los ordenamientos producidos por las dos clases de datos (fenotípica y molecular). Un resultado semejante fue obtenido por Bermejo *et al.* (2014) en un estudio del cultivo de lenteja por medio de datos morfológicos y moleculares (SSR y SRAP). En arvejas, Espósito *et al.* (2007a) compararon los datos morfológicos y moleculares obtenidos por medio de marcadores SRAP, y encontraron una correlación similar de 0,70 entre las matrices de distancia. Estos resultados sugieren que ambos sistemas de marcadores (morfológicos y moleculares) podrían brindar información bastante similar en estudios de caracterización en leguminosas.

La caracterización y evaluación de las accesiones empleando marcadores agromorfológicos y moleculares permitió identificar patrones de diversidad genética entre las accesiones de la colección de *Pisum*. Sin embargo, resultó necesario organizar dicha colección a fin de propiciar un uso y conservación más apropiado del germoplasma. De este modo, la formación de colecciones núcleo (CC) permite incrementar la eficiencia en la utilización de las colecciones conservadas en los bancos de germoplasma; al mismo tiempo que preserva, tanto como sea posible, la diversidad genética de la colección completa (Frankel, 1984; Brown, 1989a,b); y se preservará si las accesiones se separan primero en grupos con alguna significación. Según Frankel y Brown (1984) y Brown (1989b), la estratificación es importante para establecer una buena colección núcleo, siendo la agrupación por estratificación más eficaz que la no estratificación por ningún método. El procedimiento de estratificación, en el cual las accesiones se van agrupando según grados de similitud, debe ser, en general, gradual y jerárquico. De este modo, primero se hacen las divisiones principales y luego se dividen estos subgrupos en fracciones más pequeñas (van Hintum, 1994). Con frecuencia, las primeras divisiones se basan en la taxonomía, que permite separar las especies silvestres de las cultivadas y luego, dentro de estos grupos, separa las subespecies. Empleando la taxonomía y los conocimientos adquiridos acerca de la domesticación, la distribución, el historial de mejoramiento, el patrón de cultivo y la utilización de los materiales, puede desarrollarse una jerarquía estructurada que de origen a un árbol de diversidad. Siguiendo este esquema, Zong *et al.* (2008) construyeron una colección núcleo de *Pisum sativum* L. realizando una primera estratificación según el origen geográfico de las accesiones, y, luego, utilizando la información brindada por la caracterización molecular con SSR.

En este trabajo, se desarrollaron distintas metodologías que permitieron obtener seis posibles CCs (Figura 2.3.); las cuales abarcaron el considerar previo a los análisis de agrupamiento los datos taxonómicos de las accesiones y diferentes estrategias específicas de muestreo para determinar el número de accesiones a elegir dentro de cada grupo. Dos CCs adicionales fueron obtenidas utilizando el programa *PowerCore*. Luego, estos conjuntos núcleo fueron evaluados por medio de diferentes criterios, a fin de seleccionar la CC que fuera más representativa de la colección original o activa (CA).

En el proceso de validación de las CCs, el criterio basado en el valor promedio, la variancia y otras estadísticas de resumen, tales como el coeficiente de variación y el rango, ha sido utilizado principalmente para evaluar la calidad de las CCs construidas en base a datos

morfológicos de tipo cuantitativos (Diwan *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2000; Tai y Miller, 2000; Wang *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos mostraron que las CCs desarrolladas considerando la estratificación taxonómica (E2), presentaron menores valores de [MD] y [VD] (Tabla 2.6 a,b). Lo mismo se detectó, en general, para estas CCs en relación a la diferencia relativa porcentual de valores medios (MD%) y de varianzas (VD%). De este modo, los valores promedios y varianzas en cada variable de las CC fueron muy cercanos a los correspondientes a la colección original y las diferencias encontradas entre dichos valores fueron no significativas. Por esto, el considerar una primera división taxonómica resultó óptimo en el proceso de construcción de la CC; ya que las CCs derivadas mostraron ser más representativas de la colección original al presentar valores promedios y varianzas semejantes a los de la CA.

Por otra parte, a fin de determinar el número de accesiones que serían seleccionadas dentro de cada grupo o *clúster* para conformar la CC, se utilizó el método propuesto por Brown (1989a,b); el cual se basa en el tamaño del grupo. Esta metodología establece la aplicación de diferentes procedimientos, los cuales generalmente se conocen como estrategias fija (F), proporcional (P) y logarítmica (L). La evaluación de la calidad de las CCs según el parámetro VR%, el cual permite comparar los valores del coeficiente de variación entre las CCs y la CA, evidenció que las CCs obtenidas a partir de la estrategia P, fueron en gran medida menos representativas, ya que presentaron los menores porcentajes VR%; y, para el caso particular de la colección E2P, dicho parámetro fue menor que el 100% (Tabla 2.6 c). Si VR% es inferior al 100%, los coeficientes de variación de cada variable en la colección inicial son mayores a los correspondientes de la CC, indicando que los valores de las variables en la CC en cuestión son más homogéneos y disminuyó la variabilidad. Además, la colección E2L, desarrollada a partir de la estrategia L y las colecciones PC y PC* mostraron los valores más altos del porcentaje de coincidencia de rango (CR%). De este modo, las colecciones E2L, PC y PC* mostraron una alta heterogeneidad de los valores en cada variable comparado con la CA, y fueron las que mantuvieron el mayor número de accesiones que presentaron valores extremos en cada variable cuantitativa. Asimismo, estas medidas y estadísticas de resumen resultaron útiles ya que permitieron comparar y validar las distintas CCs a nivel morfológico.

La eficiencia de las distintas estrategias ha sido comparada por varios investigadores (Brown, 1989; van Hintum *et al.*, 1995; Mahajan y Bisht, 1999), los cuales concluyeron que las más adecuadas fueron las estrategias L o P según el caso. Las estrategias F y L favorecen a los grupos pequeño; es decir, un mayor porcentaje de las entradas son seleccionadas de los

grupos pequeños en comparación con los grandes grupos (Brown *et al.*, 1989). En cambio, la estrategia P favorece a los grupos de mayor tamaño, reteniendo un mayor número de accesiones perteneciente a estos grupos; los cuales logran una mayor representación dentro de la CC. De este modo, en este trabajo la estrategia logarítmica aumentó la proporción de accesiones que se encontraban en los grupos pequeños, que probablemente fueron los que presentaron una mayor variabilidad ya que correspondieron principalmente a las formas silvestres del género *Pisum*, tales como la ssp. *elatius* y *P. fulvum*; en cambio, los grupos de mayor tamaño correspondieron principalmente a la variedad botánica *sativum*.

Así, la colección núcleo EL2, junto a la colección PC, resultaron las más representativas de la colección original, en función de todas las estadísticas de resumen para las características cuantitativas morfológicas. Sin embargo, la colección PC presentó un valor de VD% levemente superior al límite del 20% (Tabla 2.6 b).

Otro criterio existente para validar las CCs es el índice de Shannon-Weaver (ShW) que es un criterio útil para la evaluación cuando se dispone de variables categóricas. Ha sido usado para evaluar la calidad de distintas colecciones núcleo del género *Pisum* (Zong *et al.*, 2009; Smýkal *et al.* 2008b) al reflejar la heterogeneidad de una población sobre la base de dos factores: el número de alelos presentes (o categorías para una variable cuantitativa) y su abundancia relativa. Si en una población existe, para un locus determinado, un alelo que se encuentra en alta frecuencia, el grado de incertidumbre será más bajo que si todos los alelos para ese particular locus estuvieran con frecuencia similares. Así, el valor del Índice de Shannon-Weaver es mínimo (cero), cuando hay sólo un alelo presente y es máximo, si para un número fijo de alelos, los mismos se encuentran con frecuencias similares (Balzarini *et al.*, 2010); por lo que al tomar el índice un valor elevado es indicativo de la diversidad genética presente. Asimismo, este índice resulta adecuado para comparar la diversidad genética entre poblaciones y puede ser utilizado para evaluar la calidad de una colección núcleo al comparar su valor con el correspondiente a la colección completa, esperando que el índice en la CC se acerque lo más posible al valor que presenta en la colección original (Bisht *et al.*, 1998; Mahalakshmi *et al.*, 2007; Dwivedi *et al.*, 2008; Upadhyaya *et al.*, 2009).

El índice de ShW fue calculado, por un lado, a partir de las variables morfológicas cualitativas y, por otro lado, con los datos moleculares. La comparación de este índice entre la colección original y todas las CCs, no mostró en general, diferencias significativas al 5 %

(Tablas 2.7 y 2.8). La excepción fue la colección E1F que fue significativamente diferente a la colección original en cuanto a los descriptores cualitativos; lo cual se manifestó en el diagrama de cajas correspondiente (Figura 2.4), e indicó que esta CC no reflejó la diversidad genética existente en la CA. La colección original presentó el valor máximo de este índice, el cual fue 2,174. Smýkal *et al.* (2008b) reportó un valor medio de ShW cercano a 1 para 164 accesiones de *P. sativum* spp. *sativum* caracterizadas a partir de 15 descriptores morfológicos cualitativos, tales como color de flor, coloración del tegumento del grano seco, superficie del grano seco y forma de la hoja en el primer nudo floral. El valor superior de nuestra colección, sugiere una diversidad genética superior aportada por las formas silvestres del género *Pisum* y del resto de subespecies de *P. sativum*.

En cuanto al índice de ShW calculado a partir de los marcadores moleculares, la CC que más se asemejó a la CA fue la obtenida a partir del programa PowerCore usando la información fenotípica y molecular (PC) (Figura 2.5); lo cual es congruente con el hecho de que el software utiliza la estrategia M que selecciona la combinación de accesiones tal que se maximice el número de alelos observados. Igualmente, según este índice todas las colecciones reflejan la diversidad genética presente en la colección original a nivel molecular; ya que no se observaron diferencias significativas entre las colecciones para este estimador.

Al validar las colecciones a partir de diferentes medidas de variabilidad molecular (H , A , A_e , PIC) y considerando los datos moleculares SSR y SRAP en forma separada, se pudo observar gráficamente (Figura 2.6) cómo las CC desarrolladas utilizando la estrategia fija F difieren de la colección activa según los marcadores microsatélites. Esto concuerda con los resultados obtenidos al realizar la validación a nivel fenotípico. Tal disminución de la variabilidad genética observada en las colecciones E1F y E2F, probablemente estuvo relacionada con el tamaño muy reducido de estas CC con respecto a la colección original; el cual fue alrededor del 15% de la colección inicial. Además, este menor tamaño de las colecciones F, pudo haber llevado a la gran disminución en el nivel de polimorfismo (%P) detectada en las mismas (Tabla 2.9). El nivel de polimorfismo, calculado como la relación de las bandas polimórficas sobre las bandas totales, se evaluó para los marcadores moleculares SRAP. La disminución del polimorfismo que se observó prácticamente en todas las CCs, se debió, en general, a la pérdida de bandas. Cada loci está codificado como presencia (1) o ausencia (0) de banda. Al desaparecer la banda de un determinado locus en una particular CC, este locus pasa a ser "0" para todas las accesiones de dicha CC y el programa lo considera como una banda

monomórfica. La colección E2P fue la que presentó una reducción menor del nivel de polimorfismo. La colección núcleo PC, construida mediante el software PowerCore, mantuvo el mismo nivel de polimorfismo que la colección de partida.

El programa PowerCore aplica la estrategia M y permite desarrollar colecciones núcleo en las cuales todos los alelos o clases de observaciones están representadas, al tiempo que garantiza la menor redundancia alélica. Trabajos previos han reducido el gran tamaño de colecciones de germoplasma de arroz a partir de SSR y/o descriptores fenotípicos utilizando dicho programa (Agrama *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Khaing *et al.*, 2013). Este software convierte, inicialmente, los datos cuantitativos en clases y genera los histogramas para cada variable. El número de clases para cada variable continua puede ser ajustado por el usuario. Luego, selecciona el número de entradas de la CC en función del número de clases y caracteres; es decir, mayor es el número de clases, variables y/o alelos, mayor es el tamaño de la CC. Esta última característica del programa de retener todas las clases y alelos, se manifestó como una desventaja para este trabajo; ya que resultó en un tamaño de CC mayor al predeterminado. Cada banda de los marcadores SRAP, codificada como un carácter binario (presencia, "1" y ausencia,"0"), fue considerada una variable. Así, el número de variables fue muy elevado, lo cual se transformó en un perjuicio.

El software PowerCore fue desarrollado para una mejor aplicación en SSR (Kim *et al.*, 2007); aceptando, también, cualquier tipo de carácter cuantitativo. Los diseñadores del programa no brindaron información acerca de la utilización de marcadores dominantes que generan un perfil de múltiples bandas; tal como los SRAP. Moe *et al.* (2012) señalaron la eficacia del PowerCore en el desarrollo de una CC de frijol mungo, usando marcadores dominantes AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*). Los autores obtuvieron una CC de 222 accesiones a partir de 705 accesiones; teniendo la misma un 31,49% del tamaño de la colección original. Los resultados de este trabajo avalan parcialmente el estudio anterior; ya que si bien luego del proceso de validación, la colección PC mostró ser altamente representativa de la diversidad genética existente en la colección original, esta CC no presentó un tamaño muy reducido.

El tamaño reducido de una colección núcleo es una clave de su manejabilidad y, en muchos casos, la representación de la diversidad de la colección total permite al núcleo funcionar como un conjunto de referencia de accesiones para la colección entera (Brown y

Spillane, 1999). Al utilizar el programa Power Core con sólo los descriptores fenotípicos y reducir notablemente el número de variables a considerar, el conjunto núcleo PC* presentó un 19,2% del tamaño de la CA. Si bien de este modo se comprobó que el software permite obtener colecciones núcleo de tamaño reducido, la colección PC* mostró diferencias significativas con respecto a la colección original a nivel molecular (Tabla 2.9; Figura 2.6).

A partir de todos los criterios utilizados en este trabajo para validar las CCs, se logró determinar que la colección núcleo E2L fue la más representativa de la colección original de germoplasma de *Pisum*. Además, la colección E2L incluyó accesiones de todos los distintos taxa de *Pisum* que estaban presentes en la colección activa. La distribución espacial de las entradas de E2L mostró ser bastante balanceada con respecto a la distribución de las accesiones de la colección inicial en el gráfico de dispersión obtenido del APG (Figura 2.7). Este método visual para evaluar la calidad de las CC fue utilizado por otros autores a partir de los gráficos obtenidos de los Análisis de Componentes Principales (Bisht *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2006; Mahajan *et al.*, 2007). En este trabajo se extendió al Análisis de Procrustes Generalizado. Sin embargo, si bien la distribución de las entradas de la CC fue balanceada, se pudo observar una mayor proporción de entradas con genotipos y fenotipos extremos en E2L. Esto sugiere que, si bien se logró elaborar una CC con representatividad de los patrones de variación de los descriptores fenotípicos y moleculares de la CA, la colección E2L fue representativa de la diversidad genética total.

CONCLUSIONES GENERALES

- Entre las accesiones de la colección activa se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) para todas las características cuantitativas evaluadas en cada año.
- Los efectos del ambiente y de la interacción accesión por ambiente fueron significativos, para muchas de las variables cuantitativas evaluadas.
- Los Análisis de Variancia Molecular para ambos marcadores moleculares sugirieron que existe variabilidad genética entre y dentro las distintas taxa de *Pisum*.
- Los recursos fitogenéticos disponibles de *Pisum* presentaron una muy elevada variabilidad genética; lo cual se detectó a nivel de los marcadores fenotípicos cualitativos, fenotípicos cuantitativos y moleculares.
- La estratificación inicial considerando la información taxonómica (E2), resultó un criterio favorable en el proceso de elaboración de la CC para la colección activa de *Pisum*.
- La estrategia PC resultó adecuada en cuanto a que mantuvo la variabilidad molecular y fenotípica presente en la colección inicial; sin embargo, presentó la desventaja de retener un elevado número de accesiones.
- La colección núcleo conformada a partir de la estrategia E2L fue la que mejor representó la variabilidad genética inicial, conservando un 28% de las accesiones.

La caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos de *Pisum* permitió establecer las relaciones genéticas y conocer cuán amplio es el rango de variabilidad genética existente. Así se logró distinguir los genotipos y fenotipos, y constituir una colección núcleo; favoreciendo la conservación y la utilización actual o futura de los recursos genéticos.

Además, otras conclusiones adicionales fueron:

- Los análisis de las relaciones genéticas entre las accesiones disponibles de *Pisum*, concuerdan con la existencia de tres especies: *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum*.

- La variedad botánica *macrocarpon* mostró estar muy relacionada genéticamente con la variedad botánica *sativum*.
- Las variables cuantitativas que más contribuyeron en estimar las diferencias entre accesiones fueron: días a primera vaina, nudo de la primera vaina, número de vainas por parcela, longitud y ancho de la estípula, longitud y ancho de hoja, peso de grano seco por parcela y longitud de la vaina.
- Las técnicas moleculares de SRAP y SSR generaron un elevado polimorfismo; por lo cual pueden ser consideradas herramientas útiles y confiables para explorar la diversidad genética de *Pisum*.
- La utilización conjunta de SRAP y SSR llevó a una estimación de la diversidad genética más informativa; ya que estos dos tipos de marcadores moleculares brindaron información complementaria.
- La alta congruencia entre los métodos morfológicos y moleculares ($r = 0,776$) sugiere que ambos sistemas marcadores brindan estimaciones bastante similares respecto a la variabilidad presente en las accesiones de *Pisum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie, T.** (2001). Desarrollo de Colecciones Núcleo de Recursos FitoGenéticos. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR.
- Abadie, T.** (2001). Desarrollo de Colecciones Núcleo de Recursos FitoGenéticos. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR.
- Agrama, H. A., Yan, W., Lee, F., Fjellstrom, R., Chen, M., Jia, M. y McClung, A.** (2009) Genetic Assessment of a Mini-Core Subset Developed from the USDA Rice Genebank. *Crop Science*, 49(4): 1336-1346.
- Ahmad, S., Kaur, S., Singh, M., Dylan Lamb-Palmer, N., Lefsrud, M. y Singh, J.** (2015) Genetic diversity and population structure of *Pisum sativum* accessions for marker-trait association of lipid content. *The Crop Journal*, 3: 238-245.
- Ambrose, M.J.** (1995) From Near East centre of origin the prized pea migrates throughout world. *Diversity*, 11: 118–119.
- Andriani, J.M.** (2012) Registro y análisis de las últimas precipitaciones en la región. Boletín "infoINTA Santa Fe Sur", N° 16. ISBN/ISSN: 1853-5763.
- Aneja, B., Yadav, N., Chawla, V. y Yadav, R.** (2012) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Mol Breed*, 30(4):1635–1648.
- Balzarini, M. y Di Renzo, J.** (2003) Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I. y Di Rienzo, J.** (2010) Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina.
- Bao, S., Yuhua, H., Zong, X., Wang, L., Lichi, L., Enneking, D., Rose, I.A., Leonforte, T., Redden, R.J. y Pandull, J.** (2008) Collection of pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) germplasm in Yunnan. *Plant Genet. Res. Newsl.* 156: 11–22.

- Baranger, A.G., Aubert, G., Arnau, G., Lainé, A.L., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Lejeune-Hénaut, J., Lallemand, J. y Burstin, J.** (2004) Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theor Appl Genet*, 108:1309–1321.
- Barcaccia, G.** (1994) Development-comparability and potential applications of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) markers in the genus *Medicago*. *Journal of Genetics and Breeding*, 48 (2): 161-168.
- Barcaccia, G., Lucchin, M. y Parrini, P.** (2000). Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: I fondamenti metodologici. *Sementi Elette*, 5: 5-15.
- Basigalup, D.H.** (1991) Development of a core collection for alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ph.D. Thesis, Univ. of Minnesota, Minneapolis (Diss Abstr. 91-25791).
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P. M.** (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- Bastianelli, D., Grosjean, F., Peyronnet, C., Duparque, M. y Regnier, J.M.** (1998) Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.)—1 Chemical composition of different categories of pea. *Anim. Sci.*, 67: 609–619.
- Ben-Ze'ev, N. y Zohary, D.** (1973) Species relationships in the genus *Pisum* L. *Israel Journal of Botany*, 22:73-91.
- Bermejo, C., Gatti, I., Caballero, N., Cravero, V., Martin, E. y Cointry, E.** (2014) Study of Diversity in a Set of Lentil RILs Using Morphological and Molecular Markers. *Australian Journal of Crop Science*, 8(5): 689-696.
- Bisht, I.S., Mahajan, R.K. y Patel D.P.** (1998) The use of characterization data to establish the Indian mungbean core collection and assessment of genetic diversity. *Genet Resour Crop Evol*, 45(2):127–133.
- Blixt, S.** (1972) Mutation genetics in *Pisum*. *Agri Hortique Genetica*, 30: 1-293.
- Bogdanova, V.S., Galieva, E.R. y Kosterin, O.E.** (2009) Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahl. *Theor. Appl. Genet.*, 118:

801–809.

- Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E. y Posselt U.K.** (2005) Genetic diversity in European perennial rygrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breed*, 124:161–166.
- Bouhadida, M., Srarfi, F., Saadi, I. y Kharrat, M.** (2013) Molecular characterization of pea (*Pisum sativum* L.) using microsatellite markers. *Journal of Applied Chemistry*, 5: 57-61.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. y Davis, R. W.** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32: 314-331.
- Bramardi, S.J.** (2000) Estrategias para el análisis de datos en la caracterización de recursos genéticos. Tesis doctoral, depto de estadística e investigación operativa. Universidad Politécnica de Valencia, España. 388 pp.
- Brown, A.H.D.** (1989a) The case for core collection. In: *The use of plant genetic resources*. Pp. 136-156. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brown, A.H.D.** (1989b) Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome*, 31:818-824.
- Brown, A.H.D. y Schoen, D.J.** (1994) Optimal sampling strategies for core collections of genetic resources. *Conservation Genetics*, 68: 357-370.
- Brown, A.H.D. (1995)** The core collection at the crossroads. p. 3-19 en: *Core collections of plant genetic resources* (T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L. van Hintum y E.A.V. Morales, eds.). John Wiley and Sons, Reino Unido.
- Brown, A.H.D. y Spillane, C.** (1999) Implementing core collections—principles, procedures, progress, problems and promise. In: Johnson RC, Hodgkin T (eds) *Core Collections for Today and Tomorrow*. Crop Science Society of America, Madison, pp 1–10.
- Budak, H., Shearman, R. C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R. E., Riordan, T. P. y Dweikat, I.** (2004) Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 328-334.

- Burstin, J., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Aubert, G. y Baranger, A.** (2001) Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding*, 120:311-317.
- Casadevall, R.; Martín, E. y Cravero, V.** (2011). Simple sequence repeat (SSR) vs. sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for *Cynara cardunculus* characterization. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2): 453-459.
- Chang, T.T.** (1994) Plant genetic resource conservation and utilization. *Encyclopedia Agric. Sci.*, 3:295.
- Cieslarova, J., Smykal, P., Dočkalova, Z., Hanaček, P., Prochazka, S., Hybl, M. y Griga, M.** (2011) Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58: 439–451.
- Coyne, C.J., Brown, A., Timmerman-Vaughan, G.M., McPhee, K.E. y Grusak, M.A.** (2005) Refined USDA-ARS pea core collection based on 26 quantitative traits. *Pisum Genetics* 37, 3–6.
- Coyne, C.J., McGee, R.J., Redden, R.J., Ambrose, M.J., Furman, B.J. y Miles, C.A.** (2011) Genetic Adjustment to Changing Climates: Pea. In *Crop Adaptation to Climate Change*; Yadav, S.S., Redden, R.J., Hatfield, J.L., Lotze-Campen, H., Hall, A.E., Eds.; Wiley Blackwell: Chichester, UK; Chapter 8, pp. 238–250.
- Cravero, V., Martín, E. y Cointry, E.** (2007) Genetic diversity in *Cynara cardunculus* determined by sequence-related amplified polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 208-212.
- Crippa, I.** (2014) Evaluación de la variabilidad genética disponible en *Cynara cardunculus* L. a fines de optimizar su conservación e inclusión en programas de mejoramiento. Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias. UNR. 205 pp..
- Crossa, J., DeLacy, I.H. y Taba, S.** (1995) The use of multivariate methods in developing a Core Collection. In: *Core collections of plant genetic resources*. Pp. 77-89. John Wiley and sons, NY.
- Cuadras, C.M.** (2012) *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante*. CMC Editions, Barcelona.

- Cubillos, A.** (1994). Recursos fitogenéticos de la biodiversidad chilena: Una proposición de priorización para su preservación. *Simiente* 64(4): 229- 235.
- Davis, P.H.** (1970) *Pisum* L. In: Davis PH (ed.) Flora of Turkey and East Aegean Islands. vol. 3. Edinburg: Edinburg University Press, pp. 370–373.
- De Bernardis, L.** (2014) Informe de legumbres argentinas campaña 2013-2014. www.todoagro.com.ar
- De Facio, R.** (2009) Caracterización y evaluación de la variabilidad genética en poblaciones nativas de maíz (*Zea mays* L.) de la provincia de Buenos Aires en base a descriptores morfológicos y agronómicos Tesis de Maestría en Genética Vegetal. INTA-UNR. Argentina. 93 pp..
- De la Vega, A.J., Chapman, S.C. y Hall, A.J.** (2001) Genotype by environment interaction and indirect selection for yield in sunflower: I. Two-mode pattern analysis of oil and biomass yield across environments in Argentina. *Field Crops Research*, 72: 17-38.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E. y De Loose, M.** (2001) AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1254-1265.
- Dice, L. R.** (1945). Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Diwan, N., McIntosh, M.S. y Bauchan, G.R.** (1995) Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theor. Appl. Genet.*, 90:755–761.
- Dixon, R.A. y Sumner, L.W.** (2003) Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.*, 131: 878–885.
- Doyle, J.J., y Doyle, J.L.** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Dribnokhodova, O. P. y Gostimsky, S. A.** (2009) Allele polymorphism of microsatellite loci in pea *Pisum sativum* L. lines, varieties, and mutants. *Russian Journal of Genetics*, 45: 788–793.

- Dwivedi, S.L., Puppala, N., Upadhyaya, H.D., Manivannan, N. y Singh, S.** (2008) Developing a core collection of peanut specific to Valencia market type. *Crop Sci*, 48:625–632.
- Ellis, T. H. N., Poyser, S. J., Knox, M. R., Vershinin, A. V. y Ambrose, M. J.** (1998) Polymorphism of insertion sites of Ty1-copiaiclass retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Mol. Gen. Genet.* 260: 9–19.
- Ellis, T.H.N., Hofer, J.I., Timmerman-Vaughan, G.M., Coyne, C.J. y Hellens, R.P.** (2011) Mendel, 150 years on. *Trends Plant Sci.*, 16: 590–596.
- Ellis, T.H.N.** (2011) Pisum. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*; Kole, C., Ed.; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, Germany; chapter 12, pp. 237–248.
- EMBRAPA** (1996) *Glossario de recursos genéticos vegetais*. Brasil. 62 p.
- Enciclopedia Agropecuaria Terranova** (1998) *Producción Agrícola 1*. Terranova Editores Ltda. Impresos S.A. Tomo 2. Santa Fe de Bogotá-Colombia.
- Espósito, M. A., Martin, E. A., Cravero, V. P., López Anido, F. S. y Cointry, E.** (2007a) Characterization of pea accessions by SRAP's markers. *Scientia Horticulturae*, 113: 329-335.
- Espósito, M. A., Milanesi, L.A., Martin E. A., Cravero V. P., López Anido F. S. y Cointry E. L.** (2007b) Analysis based on morphological, protein and SRAP markers in pea (*Pisum sativum* L). *International Journal of Plant Breeding*, 1(2):129-134.
- Espósito, M. A., Milanesi, L.A., Martin, E. A., Cravero, V. P., López Anido, F. S. y Cointry, E.** (2009) Comparison of morphological and molecular data for pea (*Pisum sativum*) in low and high yielding environments. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37:227-233.
- Esquinas, A.J.** (1981) *Los Recursos fitogenéticos, una inversión segura para el futuro*. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Investigaciones Agrarias. Madrid. 44 p.

- Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M.** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479–49.
- F.A.O.** (1996a). Informe sobre el estado de los Recursos Fitogenéticos en el mundo. Dirección de Producción y Sanidad Vegetal FAO (ed.), Roma (Italia).
- F.A.O.** (1996b). Global plan of action for the conservation and sustainable utilization of plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma.
- F.A.O.** (1998) Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Quinta Reunión Extraordinaria. Aspectos técnicos que intervienen en la elaboración de una lista de cultivos para el sistema multilateral en el marco del compromiso internacional revisado. Roma.
- F.A.O.** (2010) Segundo Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el mundo. Dirección de Producción y Sanidad Vegetal FAO (ed.), Roma.
- FAOSTAT** (2015). Available online: <http://faostat.fao.org>
- Ferriol, M., Picó, B. y Nuez, F.** (2003) Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 271-282.
- Ferriol, M., Pico, B., Fernandez de Córdova, P. y Nuez, F.** (2004). Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Science*, 44: 653-664.
- Ford, R., LeRoux, K., Itman, C., Brouwer, J.B. y Tayler, P.W.J.** (2002) Diversity analysis and genotyping in *Pisum* with sequence tagged microsatellite (STSM) primers. *Euphytica*, 124:397–405.
- Franco, T. L. y Hidalgo, R.** (eds.) (2003) Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.

- Frankel, O.H.** (1984). Genetic perspectives of germplasm conservation. p. 161-170 en: Genetic manipulation: Impact on man and society (W. Arber, K. Llimensee, W.J. Peacock y P. Starlinger, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Frankel, O. H. y Brown, A. H. D.** (1984) Plant genetic resources today: A critical appraisal. In: Crop genetic resources: Conservation and evaluation. Holden J.H.W. and Williams J.T. (eds.). Pp. 249-257. London.
- Gatti, I., Espósito, M.A., Almirón, P., Cravero, V.P y Cointry, E.L.** (2011) Diversity of pea (*Pisum sativum*) accessions based on morphological data for sustainable field pea breeding in Argentina. Genetic and Molecular Research, 10 (4): 3403-3410.
- Goldstein, D. B. y Pollock, D. D.** (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. Journal of Heredity, 88: 335-342.
- González, E.G.** (2003) Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia 59(2-3):377-388.
- Gower, J. C.** (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. Biometrics, 27:857–871.
- Gower, J.C.** (1975) Generalizad Procrustes Analisis. Psychometrika, 40: 33-51.
- Graham, P.H. y Vance, C.P.** (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiol., 131: 872–877.
- Green, F.N.** (2008). Classification of *Pisum sativum* subsp. *sativum* cultivars into groups and subgroups using simply inherited characters. Acta Hortic., 799: 155-162
- Gugerli, F., Brodbeck, S., Holderegger, R.** (2008) Insertions–deletions in a microsatellite flanking region may be resolved by variation in stuttering patterns. Plant Mol Biol Rep, 26: 255–262.
- Guo, D., Zhang, J., Liu, C., Zhang, G., Li, M. y Zhang, Q.** (2012). Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers. Tree Genetics & Genomes, 8: 789-800.

- Haider, A. S., Fouad, W. M., Soliman, M. A., y 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(17): 1608-1616.
- Hawkes, J.G.** (Ed.) (1991) Genetic conservation of world crop plants. Academic Press, London. 87 p.
- He, C., Liu, Y., Wu, K., Yuan, M., Feng, Q., Liu, Y., Yan, Q., Guan, J., Rose, I.A., Redden, R.J., et al.** (2008) Collecting and surveying landraces of pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) in Qinghai province of China. *Plant Genet. Res. Newsl.*, 156: 1–10.
- Hidalgo, R.** (1991) Conservación *ex situ*. En: Técnicas para el manejo y uso de los recursos fitogenéticos vegetales. (Eds. R. Castillo, J. Estrella y C. Tapia). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador. p. 71
- van Hintum, T.J.L.** (1995). Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: Core collections of plant genetic resources. Hodking, T., A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum and E.A.V. Morales, (eds.). Pp. 23-34. John Wiley and sons, New York.
- van Hintum, T.J.L.** (1999). The general methodology for creating a core collection. In: Core collections for today and tomorrow. Johnson R.C. and T Hodgkin, (eds.) Pp. 10-17. IPGRI, Rome, Italy.
- van Hintum, T.J.L., Brown, A.H.D., Spillane, C. y Hodgkin, T.** (2000) Core Collection of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome.
- Henry, R.J.** (1997) Practical applications of plant molecular biology. Chapman and Hall, London, pp 59–98.
- Hofer, J.M.I. y Ellis, T.H.N.** (1998) The genetic control of patterning in pea leaves. *Trends in Plant Science*, 3: 439-444.
- Honig, J., Bonos, S. y Meyer, W.** (2010) Isolation and characterization of 88 polymorphic microsatellite markers in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *HortScience*, 45(11): 1759-1763.

- Hu, J., Zhu, J. y Xu, H.M.** (2000a) Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theor. Appl. Genet.*, 101:264-268.
- Hu, J., Zhu, J. y Xu, H.M.** (2000b) A method of constructing core collection reserving special germplasm materials. *J. Biomath.*, 16:348-352.
- IBPGR** (1991) Annual report. International Board for Plant Genetic Resource, Rome.
- Jaradat, A.A.** (1995) The dynamics of a core collection. In: Core collections of plant genetic resources. Hodking, T., A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum and E.A.V. Morales, (Eds.). pp. 179-186. John Wiley and sons, New York.
- Jaramillo, S. y Baena, M.** (2000) Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos. Cali, Colombia.
- Jing, R., Vershinin, A., Grzebyta, J., Shaw, P., Smykal, P., Marshall, D., Ambrose, M., Ellis, T.H.N. y Flavell, A.** (2010) The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evol Biol*, 10:44.
- Jing, R., Ambrose, M.A., Knox, M.R., Smykal, P., Hybl, M., Ramos, Á , et al** (2012). Genetic diversity in European *Pisum* germplasm collections. *Theor Appl Genet*, 125: 367–380.
- Jones, N., Ougham, H. y Thomas, H.** (1997) Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist*, 137: 165-177.
- Kang, C.W., Kim, S.Y., Lee, S.W., Mathur, P.N., Hodgkin, T., Zhou, M.D., Lee, R.J.** (2006) Selection of a core collection of Korean sesame germplasm by a stepwise clustering method. *Breeding Sci*, 56(1):85–91.
- Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J. N. y Lang, D. J.** (2002) Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp): evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting. *Crop Science*, 42: 2118-2127.

- Khaing, A. A., Moe, K. T., Chung, J.-W., Baek, H.-J. y Park, Y.-J.** (2013) Genetic diversity and population structure of the selected core set in *Amaranthus* using SSR markers. *Plant Breeding*, 132: 165–173.
- Kim, K.W., Chung, H.K., Cho, G.T., Ma, K.H., Chandrabalan, D., Gwag, J.G., Kim, T.S., Cho, E.G. y Park, Y.J.** (2007) PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. *Bioinformatics.*, 23(16):2155-62.
- Kloz, J.** (1971) Serology of the Leguminosae. In: *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. pp. 309-365. Eds. Academic Press, London.
- Kosterin, O.E. y Bogdanova, V.S.** (2008) Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum L.* as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 735-755.
- Kwon, S.J., Brown, A.F., Hu, J., McGee, R.J., Watt, C.A., Kisha, T., Timmerman Vaughan, G.M. y Coyne, C.J.** (2012) Population Genetic Sub-structure within the USDA ARS *Pisum* Core Collection and Its Potential as a Platform for Association Mapping. In *Proceedings of the Plant & Animal Genomes XV Conference*, San Diego, CA, USA, 13–17.
- Lewontin, R.C.** (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol*, 6:381–398.
- Li, G. y 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, Z., Zhang, H.L., Cao, Y.S., Qiu, Z.E., Wei, X.H., Tang, S.X., Yu, P., Wang, X.K.** (2003) Studies on the sampling strategy for primary core collection of Chinese indigence. *Acta Agron Sin*, 29:20-24.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., et al.** (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402: 761-768.

- Lia, V.V., Bracco, M., Gottlieb, A.M., Poggio, L. y Confalonieri, V.A.** (2007) Complex mutational patterns and size homoplasmy at maize microsatellite loci. *Theor Appl Genet*, 115:981–991.
- Loridon, K., McPhee, K., Morin, J., Dubreuil, P., Pilet-Nayel, M.L., Aubert, G., Rameau, C., Baranger, A., Coyne, C., Lejeune-Henaut, I. y Burstin, J.** (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet*, 111:1022–1031.
- Mackay, M.C.** (1995) One core collection or many? In: Core collections of plant genetic resources. Hodking, T., A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum and E.A.V. Morales, (eds.). Pp. 199-210. John Wiley and sons, New York.
- Mahajan, R.K.; Bisht, I.S.** (1999) Sampling strategies for developing an Indian sesame core collection. *Para: Plant Foods for Human Nutrition*.
- Mahajan, R.K., Bisht, I.S. y Dhillon, B.S.** (2007) Establishment of a core collection of world sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm accessions. *Sabrao J Breed Genet*, 39:53–64.
- Mahalakshmi, V., Ng, Q., Atalobhor, J., Ogunisola, D., Lawson, M. y Ortiz, R.** (2007) Development of a West African yam *Dioscorea* spp. corecollection. *Genet Resour Crop Evol*, 54:1817–1825.
- Makasheva, R.K.** (1979) Gorokh (pea). In: Korovina ON (ed.) Leningrad: Kulturnaya Flora SSR, Kolos, pp. 1–324 (in Russian).
- Mantel, N.A.** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27:209–220.
- Marshall, D.R.** (1989) Limitations to the use of germplasm collections. In: The use of Plant Genetic Resources. Brown, A.H.D., Marshall, D.R., Frankel, O.H. and Williams, J.T. (eds) Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Martin, E., Cravero, V., Portis, E., Scaglione, D., Acquaviva, E. y Cointry, E.** (2013) New genetic maps for globe artichoke and wild cardoon and their alignment with an SSR-based consensus map. *Molecular Breeding*, 32(1): 177-187.

- Martin-Sanz, A., Caminero, C., Jing, R., Flavell, A. J. y Perez de la Vega, M.** (2011) Genetic diversity among Spanish pea (*Pisum sativum* L.) landraces, pea cultivars and the World *Pisum* sp. core collection assessed by retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIPs). *Spanish J. Agric. Res.*, 9 (1): 166-178.
- Marx, GA.** (1987) A suite of mutants that modify pattern formation in pea leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 311-335.
- Maxted, N., Kell, S., Toledo, A., Dulloo, E., Heywood, V., Hodgkin, T., Hunter, D., Guarino, L., Jarvis, A. y Ford-Lloyd, B.** (2010) A global approach to crop wild relative conservation: Securing the gene pool for food and agriculture. *Kew Bull.*, 65: 561–576.
- Moe, K. T., Gwag, J.G. y Park, Y.J.** (2012) Efficiency of PowerCore in core set development using amplified fragment length polymorphic markers in mungbean. *Plant Breeding*, 131: 110–117.
- Moll, R.H. y Stuber, C.W.** (1974) Quantitative genetics - empirical results relevant to plant breeding. *Adv Agron*, 26:277-314.
- Morales, E.A.V., Valois, A.C. y Nass, L.L.** (1997) Recursos Genéticos Vegetales. Brasilia: Embrapa - SPI. EMBRAPA, CENARGEN. 78 p.
- Murfet, I.C. y Reid, J.B.** (1993) Developmental mutants. In *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, R. Casey and D.R. Davies, eds (Wallingford, UK: CAB International), pp. 165–216.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedús, G. y Taller, J.** (2012) PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50: 670-672.
- Nasiri, J., Haghazari, A. y Saba, J.** (2009) Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 8 (15): 3405-3417.
- NCBI Taxonomy** (2015) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

- Nei, M.** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.
- Noirot, M., Hamon, S. y Anthony, F.** (1996) The principal component scoring: a new method of constituting a core collection using quantitative data. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 43:1-6.
- Oliveira, M.F., Nelson, R.L., Geraldi, I.O., Cruz, C.D. y de Toledo, J.F.F.** (2010) Establishing a soybean germplasm core collection. *Field Crops Research*, 119: 277-289.
- Ortíz, R., Madsen, S., Ruíz-Tapia, E.N., Jacobsen, S.-E., Mujica-Sánchez, A., Christiansen, J.L. y Stolen, O.** (1999) Validating a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 46:285-290.
- Pacheco CH., C.A., Vergara H., M.C. y Ligarreto M., G.A.** (2009) Clasificación de 85 accesiones de arveja (*Pisum sativum* L.), de acuerdo con su comportamiento agronómico y caracteres morfológicos. *Agronomía Colombiana*, 27(3): 323-332.
- Peakall, R., Smouse, P.E. y Huff, D.R.** (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of Buffalograss. (*Buchloë dactyloides* Nutt. Engelm.). *Mol Ecol*, 4:135–147.
- Peakall, R. y Smouse, P.E.** (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Peeters, J.P. y Galgway, N.W.** (1988) Germplasm collections and breeding needs in Europe. *Economic Botany*, 42:503-521.
- Perrier, X. y Jacquemoud-Collet, J.P.** (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>
- Phillips, D.A.** (1980) Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 29–49.
- Posso, A.M.; Muñoz, J.E.; Londoño, X.** (2012). Estudio genetico utilizando marcadores microsateles de tres ejemplares de *Guadua angustifolia* recolectadas en Peru. Proyecto PD428/06 Rev.2(F)
- Powell, W., Machray, G.C. y Provan, J.** (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.*, 1(7):215-222.

- Prieto, G.** (2013) Arvejas: pequeñas con grandes perspectivas. Available online: <http://intainforma.inta.gov.ar>
- Prieto, G., Amado, R., Brassesco, R., Buschittari, D., Espósito, A., Gerster, G., Martínez, S., Martins, L., Albrecht, R., Suter, A., Vita, E. y Vizgarra, O.** (2014) Rendimiento de cultivares de arveja en diferentes ambientes de la República Argentina. Boletín "infoINTA Santa Fe Sur", N° 32. ISBN/ISSN: 1853-5763.
- PROMOSTA** (Proyecto de Modernización de los Servicios de Tecnología Agrícola) (2005). El cultivo de la arveja 2 *Pisum sativum*. 13 p.
- Reeb P.D., Bramardi, S.J. y Defacio, R.A.** (2007) Estimación y tratamiento del efecto ambiente y sus interacciones en la caracterización de Recursos Genéticos de un Banco de Germoplasma. En: XI Conferencia Española y I Encuentro Iberoamericano de Biometría. 20-22 de junio. Salamanca, España. p. 187-188.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bocktaele, E., Depicke, A. y De Loose, M.** (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6: 125-134.
- Sarikamiş, G., Yanmaz, R., Ermiş, S, Bakir, M. y Yüksel, C.** (2010) Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genet. Mol. Res.*, 9(1):591-600.
- SAS Institute** (1997). *SAS User's guide: Statistics*. 5 Ed. Cary, NC: SAS Institute Inc. 958 p. Tanksley y McCouch. 1997. *Science*, 277: 1063-1066.
- Schoen, D.J. y Brown, A.H.D.** (1995) Maximising genetic diversity in core collections of wild relatives of crop species. In: *Core collections of plant genetic resources* (Hodgkin T, Brown AHD, van Hintum ThJL, and Morales AEV, eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, 55–76.
- Shannon, C.E. y Weaver, W.** (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 pp.
- Shapiro, S.S. y Wilk, M.B.** (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591 - 611.

- Shete, S., Tiwari, H. y Elston, R.** (2000) On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical population biology*, 57: 265-271.
- Simioniuc, D., Uptmoor, R., Friedt, W. y Ordon, F.** (2002) Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed*, 121:429-435.
- Simon, C.J. y Hannan, R.M.** (1995). Development and use of core subsets of cool-season food legume germplasm collections. *HortScience*, 30:907.
- Skinner, D.Z., Bauchan, G., Auricht, G. y Hughes, S.** (1999) Developing a core collection from a large annual Medicago germplasm collection. In: Johnson R.C. and Hodgkin T., (Eds.), *Core Collections for Today and Tomorrow*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp. 61-67.
- Smith, L.G. y Hake, S.** (1994) Molecular genetic approaches to leaf development: Knotted and beyond. *Canadian Journal of Botany*, 72: 617-625.
- Smýkal, P., Horáček, J., Dostálová R. y Hýbl, M.** (2008a) Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *J. Appl. Genet.*, 49(2):155–166.
- Smýkal, P., Hýbl, M., Corander, J., Jarkovský, J., Flavell, A. y Griga, M.** (2008b) Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theor Appl Genet*, 117:413–424.
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J., et al.** (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet. Res.*, 9: 4–18.
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C. J., Ellis, N. T., Flavell, A.J., Ford, R., et al.** (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy*, 2(2): 74-115.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., et al.** (2015) Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3): 43-104.

- Smouse, P.E., Long, J.C. y Sokal, R.R.** (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zool*, 35:627–632.
- Smutkupt, S., Peyachoknagul, S., Kowitwanich, K., Onto, S., Thanananta, N., Julsrigival, S., Kunkaew, W. y Punsupa, V.** (2006). Varietal determination and genetic relationship analysis of highland legumes using SRAP markers. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 38 (1): 19-27.
- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G.** (1980) *Statistical Methods*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Snook, L.K., Ehsan, E., Jarvis, A., Scheldman, X. y Kneller, M.** (2011) Crop germplasm Diversity: The Role of Gene Bank Collections in Facilitating Adaptation to Climate Change. In *Crop Adaptation to Climate Change*; Yadav, S.S., Redden, R.J., Hatfield, J.L., Lotze-Campen, H., Hall, A.E., Eds.; Wiley Blackwell: Chichester, UK; Chapter 25, 495–506.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J.** (1981) *Biometry*. 2nd Ed. Freeman, San Francisco. 709 pp.
- Spagnoletti Zeuli, P.L. y Qualset, C.O.** (1993) Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resource collection of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87:295–304.
- Spagnoletti Zeuli, P.L.S. y Qualset, C.O.** (1995) The durum wheat core collection and the plant breeder. p. 213-228 en: *Core collections of plant genetic resources* (T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L. van Hintum y E.A.V. Morales, eds.). John Wiley and Sons, Reino Unido.
- Taba S.; Díaz J.; Franco J.; Crossa J.** (1998). Evaluation of Caribbean Accessions to Develop a Core Subset. *Crop Science*, 38:1378-1386.
- Tai, P. y Miller, J.D.** (2000) A core collection for *Saccharum spontaneum* L. from the world collection of sugarcane. *Crop Sci*, 41(3):879–885.
- Tar´an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. y 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.

- Toth, G., Gaspari, Z. y Jurka, J.** (2000). Mcrosatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Upadhyaya, H.D., Pundir, R.P.S., Dwivedi, S.L., Gowda, C.L.L., Reddy, V.G., Singh, S.** (2009) Developing a mini core collection of sorghum for diversified utilization of germplasm. *Crop Sci*, 49:1769–1780.
- Upadhyaya, H.D., Dwivedi, S.L., Ambrose, M., Ellis, N., Berger, J., Smýkal, P., Debouck, D., Duc, G., Dumet, D., Flavell, A., et al.** (2011) Legume genetic resources: Management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. *Euphytica*, 180: 27–47.
- UPOV** (2005) Internacional Union for the Protection of new Varieties of Plants: *Pisum sp.*
- Vershinin, A.V., Alnutt, T.R., Knox, M.R., Ambrose, M.R. y Ellis, T.H.N.** (2003) Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution and domestication. *Mol Biol Evol*, 20:2067-2075.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kniper, M. y Zabeau, M.** (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wang, J.C., Hu, J., Zhang, C.F. y Zhang, S.** (2007). Assessment on evaluating parameters of rice core collections constructed by genotypic values and molecular marker information. *Rice Science*, 14(2):101–110.
- Wang, Y.Z., Zhang, J.H., Ning, N., Sun, H.Y. y Yang, L.** (2011). Construction and evaluation of a primary core collection of apricot germplasm in China. *Scientia Horticulturae*, 128:311-319.
- Welsh, J. y McClelland, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Winter, P. y Kahl, G.** (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 438-448.
- Yang, R.C. y Baker, R. J.** (1991) Genotype-environment interactions in two wheat crosses. *Crop Science*, 31:83-87.

- Yonezawa, K., Nomura, T. y Morishima, H.** (1995) Sampling strategies for use in stratified germplasm collections. Pp. 35-54 In: Core collections of plant genetic resources (T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L. van Hintum y E.A.V. Morales, eds.). John Wiley and Sons, Reino Unido.
- Zhang, L., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovitch, S., Dean, R. y Hanna, W.** (1999) Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 895-902.
- Zhang, J., Wang, Y., Zhang, X.Z., Li, T.H., Wang, K, Xu, X.F. y Han, Z.H.** (2010). Sampling strategy to develop a primary core collection of apple cultivars based on fruit traits. *African Journal of Biotechnology*, 9:123-127.
- Zhao, W. G., Cho, G.T., Ma, K.H., Chung, J.W., Gwag, J.G. y Park, Y.J.** (2010) Development of an allele-mining set in rice using a heuristic algorithm and SSR genotype data with least redundancy for the post-genomic era. *Mol. Breed.*, 26: 639-651.
- Zohary, D. y Hopf, M.** (2000) *Domestication of Plants in the Old World*; Oxford University Press:Oxford, UK.
- Zong, X.X., Guan, J.P., Wang, S.M., Liu, Q.C., Redden, R.R. y Ford, R.** (2008) Genetic Diversity and Core Collection of Alien *Pisum sativum* L. Germplasm. *Acta Agron Sin*, 34(9):1518-1528.
- Zong, X., Redden, R.J., Liu, Q., Wang, S., Guan, J., Liu, J., Xu, J., Liu, X., Gu, J., Yan, L., Ades, P. y Ford, R.** (2009a) Analysis of a diverse global *Pisum* sp. collection and comparison to a Chinese local *P. sativum* collection with microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, 118:193–204.
- Zong, X., Ford, R., Redden, R.R., Guan, J. y Wang, S.** (2009b) Identification and Analysis of Genetic Diversity Structure Within *Pisum* Genus Based on Microsatellite Markers. *Agricultural Sciences in China*, 8(3): 257.

ANEXO

Tabla 1: Lista de accesiones del género *Pisum* de la colección activa.

Código (cod)	Accesión	Origen
<i>Pisum sativum</i> ssp. <i>sativum</i> var. <i>sativum</i>		
2	KING TUT-PURPLE POD	Estados Unidos
3	ROMACK	Estados Unidos
6	ALASKA W.R.	Estados Unidos
7	GRANADA	Estados Unidos
8	WONDER MARROWFAT	Estados Unidos
9	MAYFLOWER	Estados Unidos
10	GYPSY	Estados Unidos
12	DANTE	Estados Unidos
14	LEO	Estados Unidos
15	CUARENTINAS	Argentina
16	No. 4476	Argentina
17	ERVILHA TORTA FLOR ROXA	Brasil
18	ARVEJAS AMARILLAS	Venezuela
19	ARVEJAS VERDES	Venezuela
20	SHANDIL	India
210	PATANI (b)	India
211	PATANI (c)	India
22	NGB	Suecia
24	MIRANDA	The Netherlands (Los Países Bajos)
25	HOHONHEIMER PINK-FLOWERED	Alemania
26	THIRTY-DAYS	Japón
27	No. 338 [22]	China
280	MATTAR (b)	Pakistán
281	MATTAR (c)	Pakistán
29	MOSHONG	Afganistán
30	CHINESE PURPLE	Canadá
31	PAI WAN TOU	China
32	ILCA 5115	España
33	Aa 38	Reino Unido
34	ILCA 5041	Etiopía

Código (cod)	Accesión	Origen
35	22718	Turquía
36	ILCA 5073	Afganistán
37	ILCA 5075	Siria
53	PICCOLLO PROVENZALE	Italia
54	INCA	América del Sur
55	FACON	Estados Unidos
56	ZAV 1	Programa de mejoramiento local
57	ZAV 2	Programa de mejoramiento local
58	ZAV 4	Programa de mejoramiento local
59	ZAV 9	Programa de mejoramiento local
60	ZAV 11	Programa de mejoramiento local
61	ZAV 14	Programa de mejoramiento local
62	ZAV 16	Programa de mejoramiento local
63	ZAV 18	Programa de mejoramiento local
64	ZAV 19	Programa de mejoramiento local
65	ZAV 21	Programa de mejoramiento local
66	ZAV 22	Programa de mejoramiento local
68	SPRING PEA	Australia
69	VC	Programa de mejoramiento local
70	CAN B	Holanda
71	B2001	Programa de mejoramiento local
72	G2001	Programa de mejoramiento local
73	NN16	Estados Unidos
74	ERIK II	Canadá
75	DMR7	India
76	DDR11	India
77	DDR14	India
78	KEOMA	Holanda
79	APARECIDA	Programa de mejoramiento local
80	AMARILLA	Programa de mejoramiento local
81	CAN A	Holanda
82	EXPLORER	Canadá
83	TURF	Rumania
85	EI	Holanda
86	C2001	Programa de mejoramiento local

Código (cod)	Accesión	Origen
87	ZAV5	Programa de mejoramiento local
88	ZAV10	Programa de mejoramiento local
90	ZAV15	Programa de mejoramiento local
91	ZAV17	Programa de mejoramiento local
92	ZAV20	Programa de mejoramiento local
93	ZAV23	Programa de mejoramiento local
94	ZAV25	Programa de mejoramiento local
95	ZAV26	Programa de mejoramiento local
96	MARINA	Rumania
97	VIPER	Holanda
98	EXTRA RAPID	Suecia
100	SUTTONS EARLY GIANT	Reino Unido
101	DUKE OF ALBANY	Reino Unido
102	AMERICAN WONDER	Reino Unido
103	ROI DES CONSERVES	Reino Unido
104	COBRI	Reino Unido
105	EARLY THIRTY DAYS	Japón
106	EARLY PERFECTION-1322	Estados Unidos
107	RAPID	Hungría
108	WINTER HARDY	Reino Unido
111	ARVEJA BLANCA DE SOGAMSO	Austria
112	TRIANON	Francia
113	AVON	Estados Unidos
114	TELEPHONE GOLD. STRAW.	Reino Unido
115	IMPROVED CAMBELL	Estados Unidos
116	FORTUNE	Reino Unido
117	FRISSON-nod ⁺ ,fix ⁺	Reino Unido
118	P. AXIPHUM	Alemania
119	MULTIVIRAL RESISTANT	Estados Unidos
120	ACACIA	Bulgaria
121	AFILA	Bulgaria
122	SPRUT	Rusia
891	ZAV12	Programa de mejoramiento local
892	ZAV12	Programa de mejoramiento local

Código (cod)	Accesión	Origen
<i>Pisum sativum ssp. sativum var. macrocarpon</i>		
1	SUGAR SNAP	Estados Unidos
4	GREEN SUGAR	Estados Unidos
5	ACCORD	Estados Unidos
11	SUPERCOUT	Estados Unidos
13	No. 7025 EARLY SWEET	Estados Unidos
84	COMETODO	Francia
<i>Pisum sativum ssp. jomardii</i>		
99	JOMARDII	Reino Unido
<i>Pisum sativum ssp. transcaucasicum</i>		
44	VIR K-4871	Estados Unidos
45	VIR K-2376	Estados Unidos
46	1448	Suecia
<i>Pisum sativum ssp. sativum var. arvense</i>		
47	FENN	Estados Unidos
48	1-826a	Nepal
49	PLEVEN 2	Bulgaria
50	MELROSE WINTER	Estados Unidos
<i>Pisum sativum ssp. elatius var. elatius</i>		
38	VIR 3115	Italia
39	CE-1	Ucrania
400	VIR 2524 (b)	Israel
401	VIR 2524 (c)	Israel
<i>Pisum sativum ssp. elatius var. pumilio</i>		
510	VIR 2521 (a)	Israel
511	VIR 2521 (b)	Israel
<i>Pisum abyssinicum</i>		
41	54-757	Estados Unidos
42	808	Suecia
43	1897	Marruecos
<i>Pisum fulvum</i>		
109	P. FULLVUM ISR	Israel
110	P. FULLVUM NDL	The Netherlands (Los Países Bajos)

Tabla 2: Prueba de Normalidad para los caracteres cuantitativos evaluados en la colección de *Pisum*.

Variable	Estadístico(W)	Variable	Estadístico (W)
AP	0,9636	LH	0,8734
DF	0,9481	AH	0,9079
DV	0,9486	LE	0,9871
DC	0,9339	AE	0,9767
PNF	0,9278	VP	0,8634
NPV	0,9276	NG	0,9179
LV	0,9642	DG	0,9622
AV	0,9799	PG	0,924

AP: altura de planta (cm), DF: días a 50% de floración, DV: días a primera vaina, DC: días a fin de cosecha, PNF: primer nudo floral, NPV: nudo de la primera vaina, LH: longitud de la hoja (cm), AH: ancho de la hoja (cm), LE: longitud de la estípula (cm), AE: ancho de la estípula (cm), LV: longitud de la vaina (cm), AV: ancho de la vaina (cm), VP: número de vainas por parcela, NG: número de granos por parcela, DG: diámetro de grano (mm), PG: peso de grano seco (g).

Tabla 3: Valor promedio ajustados \pm desvío estándar, rango, promedio general (μ) y coeficiente de variación (CV %) para cada variable cuantitativa en las accesiones (Ac.) de la colección *Pisum*.

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
1	220,5 \pm 14,7	47,0 \pm 0,0	53,7 \pm 0,6	111,5 \pm 1,7	11,1 \pm 0,5	11,1 \pm 0,5	7,99 \pm 0,17	1,55 \pm 0,01	5,42 \pm 0,40	2,97 \pm 0,28	8,09 \pm 0,26	4,49 \pm 0,26	345 \pm 137	1104 \pm 499	7,50 \pm 0,25	194 \pm 92
2	160,8 \pm 10,2	88,0 \pm 0,9	93,5 \pm 0,2	152,5 \pm 0,9	14,2 \pm 1,0	14,2 \pm 1,0	8,43 \pm 0,38	1,59 \pm 0,03	4,31 \pm 0,41	2,77 \pm 0,28	7,28 \pm 0,07	4,34 \pm 0,09	812 \pm 101	3032 \pm 420	9,25 \pm 0,08	680 \pm 73
3	148,5 \pm 8,9	134,0 \pm 2,6	138,8 \pm 2,5	176,5 \pm 2,9	21,8 \pm 0,6	21,8 \pm 0,6	5,42 \pm 0,14	0,97 \pm 0,03	3,28 \pm 0,39	1,92 \pm 0,47	5,37 \pm 0,66	3,18 \pm 0,32	977 \pm 475	2243 \pm 1357	5,30 \pm 0,60	116 \pm 46
4	76,0 \pm 11,0	97,0 \pm 9,1	102,7 \pm 10,9	165,0 \pm 3,3	7,3 \pm 0,7	7,5 \pm 0,6	8,01 \pm 0,13	1,28 \pm 0,03	4,18 \pm 0,21	2,73 \pm 0,00	6,37 \pm 0,28	3,75 \pm 0,07	364 \pm 202	1800 \pm 1088	6,80 \pm 0,10	250 \pm 204
5	69,0 \pm 3,8	98,5 \pm 1,3	102,0 \pm 1,8	167,0 \pm 0,4	9,5 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	8,02 \pm 0,32	1,29 \pm 0,09	4,07 \pm 0,00	2,35 \pm 0,07	6,28 \pm 0,07	3,53 \pm 0,11	715 \pm 143	3230 \pm 834	7,35 \pm 0,15	328 \pm 49
6	70,5 \pm 15,8	69,0 \pm 19,1	72,8 \pm 19,8	126,0 \pm 20,4	8,0 \pm 1,9	8,0 \pm 1,9	6,75 \pm 0,58	1,38 \pm 0,05	3,17 \pm 0,19	2,20 \pm 0,04	4,64 \pm 0,47	2,69 \pm 0,02	215 \pm 35	815 \pm 260	7,00 \pm 0,60	142 \pm 61
7	82,5 \pm 0,8	75,0 \pm 1,0	87,7 \pm 0,7	155,0 \pm 1,0	7,0 \pm 0,2	7,0 \pm 0,3	7,73 \pm 0,19	1,38 \pm 0,10	3,53 \pm 0,11	2,22 \pm 0,16	5,67 \pm 0,42	3,37 \pm 0,47	540 \pm 190	2440 \pm 743	7,90 \pm 0,02	495 \pm 212
8	170,0 \pm 14,2	93,0 \pm 4,1	96,5 \pm 3,7	165,5 \pm 2,9	12,9 \pm 2,0	12,9 \pm 2,0	7,35 \pm 0,21	1,31 \pm 0,06	4,72 \pm 0,21	2,76 \pm 0,08	6,64 \pm 0,47	3,86 \pm 0,41	1050 \pm 361	4995 \pm 1756	6,80 \pm 0,40	1001 \pm 143
9	35,7 \pm 5,1	81,0 \pm 3,3	84,1 \pm 3,0	142,5 \pm 1,3	8,3 \pm 1,5	8,3 \pm 1,4	7,11 \pm 0,33	1,28 \pm 0,09	3,81 \pm 0,69	2,58 \pm 0,29	5,34 \pm 0,23	2,99 \pm 0,19	232 \pm 51	846 \pm 275	7,30 \pm 0,24	181 \pm 65
10	73,3 \pm 4,2	112,0 \pm 0,8	114,0 \pm 2,0	168,5 \pm 1,3	10,8 \pm 1,5	10,8 \pm 1,5	7,83 \pm 0,17	1,44 \pm 0,01	4,84 \pm 1,07	3,04 \pm 0,51	6,58 \pm 0,25	4,02 \pm 0,83	430 \pm 197	1110 \pm 633	7,50 \pm 0,26	113 \pm 65
11	88,5 \pm 7,4	88,0 \pm 3,5	90,2 \pm 4,9	163,0 \pm 0,4	10,5 \pm 2,6	10,5 \pm 2,6	8,10 \pm 0,43	1,35 \pm 0,07	4,68 \pm 0,56	2,94 \pm 0,47	5,84 \pm 0,80	3,44 \pm 0,44	672 \pm 282	3004 \pm 1306	7,90 \pm 0,44	429 \pm 172
12	73,5 \pm 1,6	103,0 \pm 4,2	107,5 \pm 4,9	174,5 \pm 9,4	12,3 \pm 0,2	12,3 \pm 0,2	8,27 \pm 0,60	1,47 \pm 0,08	4,78 \pm 0,64	2,82 \pm 0,26	7,62 \pm 0,64	4,25 \pm 0,32	380 \pm 176	1498 \pm 578	7,10 \pm 0,32	206 \pm 33
13	93,0 \pm 27,8	69,0 \pm 18,0	76,2 \pm 12,5	131,5 \pm 15,9	7,0 \pm 0,1	7,0 \pm 0,4	6,75 \pm 0,17	1,22 \pm 0,04	3,70 \pm 0,33	2,61 \pm 0,27	5,47 \pm 0,42	3,21 \pm 0,13	294 \pm 156	882 \pm 335	6,65 \pm 0,23	117 \pm 78
14	92,5 \pm 9,6	92,5 \pm 0,6	98,0 \pm 0,8	167,0 \pm 0,9	10,3 \pm 1,0	10,3 \pm 1,0	8,77 \pm 0,47	1,34 \pm 0,02	5,07 \pm 0,28	3,04 \pm 0,09	7,12 \pm 0,07	3,94 \pm 0,13	915 \pm 497	2592 \pm 713	7,50 \pm 0,74	364 \pm 36
15	129,5 \pm 12,3	98,0 \pm 1,6	104,5 \pm 5,3	165,5 \pm 3,7	14,0 \pm 2,1	14,0 \pm 2,1	7,85 \pm 0,41	1,43 \pm 0,09	4,99 \pm 0,27	2,44 \pm 0,16	6,92 \pm 0,02	3,68 \pm 0,06	1215 \pm 745	4138 \pm 2417	7,75 \pm 0,60	671 \pm 287
16	69,5 \pm 11,0	81,5 \pm 8,6	86,0 \pm 8,2	139,0 \pm 22,0	12,8 \pm 1,4	12,8 \pm 1,4	6,63 \pm 0,40	1,26 \pm 0,02	3,76 \pm 0,04	1,68 \pm 0,01	5,24 \pm 0,05	2,77 \pm 0,09	1417 \pm 914	3324 \pm 2585	7,55 \pm 0,30	765 \pm 626
17	189,8 \pm 13,0	105,0 \pm 0,8	108,6 \pm 0,9	172,0 \pm 0,0	13,8 \pm 0,6	13,8 \pm 0,6	8,67 \pm 0,20	1,71 \pm 0,03	5,36 \pm 0,09	3,30 \pm 0,17	8,15 \pm 0,62	4,69 \pm 0,18	2625 \pm 845	9230 \pm 3038	8,55 \pm 0,26	997 \pm 270
18	157,0 \pm 5,9	109,5 \pm 3,7	115,5 \pm 3,8	167,5 \pm 1,2	13,3 \pm 1,8	13,3 \pm 1,8	6,43 \pm 0,14	1,18 \pm 0,03	4,93 \pm 0,22	2,76 \pm 0,08	7,59 \pm 0,50	4,04 \pm 0,21	1187 \pm 146	4413 \pm 700	5,75 \pm 0,09	477 \pm 120
19	153,8 \pm 25,0	72,5 \pm 0,6	76,3 \pm 0,6	116,5 \pm 2,9	17,9 \pm 0,4	17,9 \pm 0,4	6,53 \pm 0,10	1,17 \pm 0,04	5,47 \pm 0,23	2,84 \pm 0,16	8,22 \pm 0,35	4,13 \pm 0,36	952 \pm 547	3457 \pm 2083	5,45 \pm 0,21	275 \pm 154
20	89,3 \pm 10,9	62,5 \pm 0,9	69,0 \pm 1,2	118,5 \pm 2,0	12,5 \pm 0,3	12,8 \pm 0,3	5,28 \pm 0,30	0,94 \pm 0,05	2,24 \pm 0,20	1,22 \pm 0,26	4,20 \pm 0,38	2,32 \pm 0,16	855 \pm 161	2838 \pm 786	4,85 \pm 0,22	239 \pm 45
22	82,0 \pm 16,3	103,0 \pm 3,5	108,0 \pm 4,2	167,0 \pm 3,5	12,5 \pm 0,3	12,5 \pm 0,3	7,38 \pm 0,03	1,45 \pm 0,05	5,10 \pm 0,42	3,50 \pm 0,42	7,48 \pm 0,04	4,75 \pm 0,21	600 \pm 90	1730 \pm 104	8,50 \pm 0,05	200 \pm 84
24	79,0 \pm 0,2	87,0 \pm 0,5	92,7 \pm 0,0	156,0 \pm 0,0	14,7 \pm 0,0	14,7 \pm 0,0	7,65 \pm 0,03	1,48 \pm 0,03	4,42 \pm 0,35	2,10 \pm 0,11	5,80 \pm 0,24	3,21 \pm 0,04	1290 \pm 100	3520 \pm 144	8,30 \pm 0,08	829 \pm 29

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
25	159,3±14,1	91,5±0,9	95,6±1,2	155,0±1,2	15,3±0,3	15,3±0,3	5,49±0,08	1,03±0,05	4,10±0,18	2,15±0,07	6,02±0,02	3,27±0,19	1027±433	3080±1767	6,45±0,12	542±205
26	148,8±12,6	93,5±2,1	97,6±1,1	169,0±2,0	9,4±1,8	9,4±2,0	7,79±0,42	1,29±0,03	3,66±0,55	2,19±0,37	5,87±0,52	3,30±0,42	1110±238	4740±1214	6,65±0,33	668±301
27	183,1±11,1	101,5±4,2	114,5±4,9	175,5±0,7	13,5±2,0	15,8±1,7	5,33±0,09	1,06±0,01	4,48±1,74	2,48±0,21	5,95±1,39	2,91±0,12	1977±64	6520±520	5,55±0,60	541±28
29	121,0±11,4	75,5±1,3	79,5±1,7	123,5±0,9	22,5±0,4	22,5±0,4	4,10±0,12	0,90±0,01	5,37±2,35	2,96±1,22	7,60±2,56	3,81±1,34	1030±191	3127±556	4,35±0,38	139±19
30	118,8±3,5	99,0±1,7	103,8±2,2	165,0±0,8	15,8±0,6	15,8±0,6	7,02±0,23	1,22±0,07	4,08±0,08	2,38±0,13	6,60±0,14	3,45±0,21	1353±593	5440±2489	5,95±0,29	588±229
31	75,0±5,8	92,0±5,0	98,8±5,2	159,5±0,6	10,3±0,9	10,3±0,9	6,04±0,13	1,12±0,06	3,60±0,18	2,42±0,07	5,57±0,28	3,30±0,25	960±82	3310±294	6,15±0,40	318±21
32	189,5±11,5	96,0±1,2	100,8±0,8	176,5±3,8	12,0±0,8	12,0±0,8	7,16±0,14	1,27±0,06	5,63±0,36	2,98±0,36	6,75±0,74	3,39±0,27	2022±222	6854±1323	6,75±0,21	700±99
33	167,5±21,0	121,5±1,2	129,3±1,8	173,5±0,7	27,0±1,4	27,0±1,4	5,48±0,25	0,98±0,04	4,43±0,98	1,99±0,28	7,50±2,23	3,69±0,76	1462±538	4889±2398	5,35±0,45	449±74
34	146,5±13,3	96,0±0,9	99,8±0,2	169,5±1,2	12,8±0,2	12,8±0,2	6,28±0,24	1,01±0,03	3,85±0,03	1,96±0,08	5,74±0,23	2,91±0,20	2064±992	7910±4735	5,75±0,12	807±421
35	104,3±3,7	78,0±10,6	82,4±10,5	142,0±22,0	12,6±1,9	12,6±1,9	7,35±0,31	1,27±0,06	5,47±0,42	2,82±0,30	7,08±0,39	3,90±0,04	1715±805	6190±3471	6,20±0,28	602±263
36	138,5±18,0	114,5±2,1	117,0±2,5	170,5±0,6	16,8±0,7	16,8±0,7	7,19±1,45	1,38±0,24	3,43±0,03	1,99±0,01	5,83±0,31	3,25±0,08	1512±772	4139±2063	5,15±0,17	183±59
37	146,0±18,8	116,0±4,1	118,8±4,8	171,5±1,2	17,0±0,8	17,0±0,8	6,25±2,20	1,15±0,41	4,06±0,64	2,33±0,20	7,01±1,25	3,89±0,81	1667±231	6840±1319	7,10±0,17	682±144
38	133,0±5,0	125,0±4,3	131,8±6,8	178,0±1,6	20,8±2,2	20,8±2,2	3,58±0,10	0,68±0,04	5,45±0,10	2,58±0,21	8,85±0,02	4,19±0,08	2910±404	7609±1194	3,75±0,32	146±54
39	46,0±2,3	104,5±2,4	107,5±1,7	129,0±0,0	16,6±0,4	16,6±0,4	3,10±0,38	0,58±0,01	2,38±0,15	1,19±0,08	3,54±0,01	1,71±0,23	72±45	225±148	3,70±0,14	4±1
41	136,3±13,3	90,5±3,8	96,1±2,9	151,0±0,4	11,5±2,0	11,5±2,0	6,05±0,08	1,17±0,02	2,70±0,24	1,60±0,10	4,30±0,14	2,34±0,08	850±285	4180±1391	5,50±0,17	296±40
42	97,0±6,6	89,0±0,8	97,3±1,4	166,5±11,1	11,0±0,1	11,6±0,2	6,03±0,02	1,11±0,04	2,42±0,45	1,40±0,33	4,22±0,40	2,36±0,34	529±200	2662±1016	5,30±0,41	153±48
43	165,3±12,9	133,0±8,2	136,8±8,0	181,5±3,1	22,5±2,8	22,5±2,8	5,33±0,28	1,03±0,11	4,97±2,29	2,71±1,45	8,27±4,19	4,64±2,37	1794±339	5692±780	6,00±0,17	533±132
44	127,5±10,1	120,0±1,2	126,8±1,7	180,5±0,4	15,5±0,4	15,8±0,2	3,90±0,49	0,71±0,03	5,95±0,12	2,34±0,08	6,98±3,05	3,14±1,06	3020±90	8873±107	3,60±0,19	249±35
45	122,3±4,8	118,5±1,3	123,3±1,8	175,5±0,4	17,0±0,9	17,0±0,9	3,89±0,10	0,73±0,04	5,03±0,00	1,99±0,00	8,51±0,00	3,63±0,00	4093±130	9540±293	4,25±0,23	203±28
46	134,8±2,8	118,5±0,6	126,8±1,3	178,0±1,6	15,3±1,1	15,3±1,0	3,53±0,16	0,69±0,01	5,42±1,17	2,41±0,23	8,75±0,35	4,09±0,57	3860±393	9807±1585	3,75±0,32	195±56
47	163,0±0,0	145,0±0,0	150,5±0,2	157,0±0,0	31,0±0,2	31,0±0,2	4,92±0,00	0,90±0,00	1,78±0,00	0,95±0,00	3,52±0,00	1,88±0,00	1860±0	5730±0	5,40±0,00	325±0
49	176,0±23,5	134,0±1,5	136,0±1,2	180,0±0,0	26,5±3,7	26,5±3,7	6,40±0,03	1,10±0,03	4,05±0,82	2,45±0,45	6,23±1,06	3,95±0,42	1750±50	5290±130	6,20±0,52	418±10
50	144,0±0,0	148,0±0,0	151,0±0,0	190,0±0,0	31,0±0,0	31,0±0,0	5,20±0,00	0,90±0,00	2,32±0,00	1,30±0,00	4,85±0,00	2,37±0,00	2250±0	6430±0	4,90±0,00	471±0
53	68,3±4,1	71,0±13,9	76,3±13,7	129,5±18,4	9,5±0,5	9,5±0,4	7,84±0,35	1,27±0,06	4,00±0,53	2,25±0,35	5,77±0,66	3,86±0,62	511±354	1543±710	6,80±0,57	262±142

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
54	81,0±3,3	100,0±1,8	104,3±3,8	166,5±4,0	12,0±0,4	12,0±0,4	7,62±0,06	1,14±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	7,65±0,31	4,28±0,29	900±315	4184±1673	5,70±0,38	522±104
55	83,5±5,0	96,0±5,7	101,6±5,7	158,5±3,2	14,2±1,8	14,2±1,8	7,28±0,33	1,14±0,05	4,27±0,71	2,01±0,23	5,72±0,78	3,33±0,25	752±117	3619±579	6,30±0,32	511±70
56	89,8±1,8	97,0±0,0	100,5±1,6	160,0±2,2	12,3±0,2	12,3±0,2	7,11±0,11	1,20±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,60±0,24	3,46±0,05	955±103	3465±161	7,00±0,18	715±46
57	91,0±2,2	99,0±0,5	103,0±1,0	167,0±3,5	10,5±0,3	10,5±0,3	6,83±0,35	1,20±0,07	4,03±0,57	2,06±0,27	5,80±0,38	3,14±0,01	940±224	2500±282	6,70±0,37	326±105
58	172,8±22,3	96,0±2,4	101,3±2,2	166,5±5,3	11,0±0,5	11,0±0,5	6,85±0,17	1,19±0,04	4,50±0,14	2,51±0,01	6,99±0,23	3,80±0,14	1390±636	4545±2124	6,90±0,16	499±42
59	108,0±11,3	97,5±3,0	103,3±9,4	169,5±7,0	12,5±0,3	12,5±0,3	6,67±0,10	1,20±0,06	4,64±0,65	2,43±0,18	6,54±0,08	3,65±0,11	1560±810	3765±2534	6,60±0,32	537±428
60	105,8±1,9	91,0±0,4	94,8±1,2	160,0±3,3	13,8±0,8	13,8±0,8	8,02±0,39	1,39±0,06	4,41±0,13	2,56±0,06	6,68±0,11	3,64±0,06	614±398	2910±1823	7,75±0,19	638±48
61	163,8±54,1	89,5±2,9	95,0±2,4	158,5±1,2	13,4±0,9	13,4±0,9	7,58±0,55	1,29±0,03	4,67±0,00	3,12±0,07	7,65±0,03	5,00±0,24	850±173	2924±555	7,00±0,41	411±165
62	115,3±15,7	82,0±11,5	86,3±12,5	145,0±18,8	12,5±1,6	12,5±1,6	6,45±0,37	1,19±0,05	5,09±0,20	3,00±0,00	7,78±0,53	4,78±0,25	1840±986	5775±4064	6,75±0,58	528±243
63	77,5±7,7	93,5±3,0	97,4±2,9	160,0±4,1	12,8±1,8	12,8±1,8	6,81±0,23	1,28±0,04	4,40±0,57	2,17±0,23	6,27±0,52	3,60±0,21	887±455	3300±1615	6,50±0,39	612±187
64	123,0±7,4	93,5±0,9	98,8±1,2	164,0±0,8	13,8±0,3	13,8±0,3	7,47±0,15	1,30±0,05	4,22±1,15	2,29±0,59	6,13±1,27	3,45±0,81	2114±931	6535±3105	6,50±0,27	779±280
65	130,8±33,3	95,0±1,8	97,8±1,4	158,0±0,8	13,3±1,1	13,3±1,0	7,13±0,23	1,31±0,07	3,67±0,47	1,86±0,18	6,13±0,21	3,40±0,24	607±295	2150±776	6,60±0,30	326±71
66	78,8±1,6	90,0±1,8	95,3±3,7	158,0±1,5	12,8±0,6	12,8±0,4	8,05±0,20	1,44±0,01	5,53±0,04	2,65±0,07	6,65±0,07	3,73±0,11	805±122	3156±749	6,90±0,08	529±435
67	114,5±20,1	74,5±10,2	78,3±13,6	139,5±15,9	13,7±1,3	13,7±1,3	6,94±0,26	1,25±0,02	4,55±0,49	2,61±0,27	6,97±0,42	3,93±0,25	858±317	3003±1323	6,90±0,15	889±551
68	101,0±7,0	91,5±1,5	90,8±2,7	154,5±1,2	11,8±1,5	11,8±1,5	7,84±0,29	1,37±0,02	3,80±0,31	1,58±0,18	5,96±0,06	3,13±0,18	637±148	1934±914	6,70±0,12	287±64
69	90,0±4,8	77,5±9,4	82,4±9,8	135,0±21,2	15,0±2,5	15,0±2,5	7,58±0,30	1,17±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	5,97±0,19	3,02±0,00	680±454	2050±667	6,80±0,25	292±93
70	70,5±13,7	87,0±1,2	92,7±1,6	159,5±0,9	8,5±0,4	8,5±0,4	6,88±0,31	1,03±0,05	3,58±0,18	1,83±0,04	5,10±0,42	2,35±0,07	1195±404	6485±2017	5,60±0,23	500±112
71	95,8±14,0	76,5±11,5	82,0±13,0	159,0±3,3	13,5±3,2	13,5±3,2	7,30±0,98	1,37±0,06	5,40±0,00	3,10±0,00	7,63±0,00	4,37±0,00	818±171	2921±1104	7,30±0,00	453±172
72	87,0±8,4	88,0±0,9	94,3±1,3	156,0±1,2	16,3±0,3	16,3±0,3	7,61±0,17	1,24±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	5,12±0,54	2,65±0,31	915±155	3230±140	6,95±0,21	440±72
73	66,5±7,4	95,5±2,9	102,3±4,9	166,5±1,3	10,2±1,8	10,2±1,8	7,62±0,10	1,41±0,04	2,97±0,23	1,90±0,21	4,95±0,21	2,62±0,30	830±167	2720±486	6,60±0,59	298±123
74	146,0±0,0	95,0±0,0	107,0±0,0	166,0±0,0	15,0±0,0	15,0±0,0	7,18±0,00	1,30±0,00	3,38±0,00	1,70±0,00	4,57±0,00	2,13±0,00	667±0	2287±0	7,00±0,00	404±0
75	67,8±6,6	91,5±3,9	97,5±3,7	142,5±3,8	17,2±3,1	17,2±3,1	6,82±0,28	1,30±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	7,36±1,07	4,37±0,16	224±74	540±185	7,67±0,05	128±55
76	89,3±1,4	83,5±0,5	88,7±1,7	156,5±1,7	8,5±1,1	8,5±1,1	7,44±0,13	1,36±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	6,64±0,05	3,68±0,11	1129±264	4022±1144	6,65±0,21	408±184
77	74,0±1,7	89,0±1,8	94,9±2,5	171,0±3,4	12,1±0,5	12,1±0,5	7,08±0,18	1,26±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	6,64±0,44	3,28±0,49	1095±153	3710±523	7,75±0,20	747±173

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
78	80,5±2,6	99,0±0,4	105,3±0,3	167,0±0,0	12,5±0,5	12,5±0,5	7,50±0,01	1,23±0,02	4,59±0,23	2,52±0,30	6,81±0,48	3,38±0,11	484±262	1933±1327	6,85±0,21	525±279
79	103,5±4,5	91,0±1,0	95,5±0,8	187,0±0,5	13,5±1,2	13,5±1,2	8,30±0,25	1,63±0,12	4,22±0,30	2,47±0,12	6,25±0,54	3,18±0,49	1220±130	4360±650	7,10±0,10	415±240
80	150,0±8,2	99,0±1,2	104,0±1,1	158,0±1,2	12,5±0,5	12,5±0,5	6,07±0,17	1,07±0,03	4,55±0,53	2,41±0,39	7,00±0,42	3,54±0,16	1380±330	5577±1484	5,95±0,13	551±195
81	87,3±1,2	102,0±3,8	106,0±4,0	164,0±1,6	14,8±1,4	14,8±1,4	6,61±0,21	1,13±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	6,03±0,13	3,07±0,23	607±349	2264±1418	5,60±0,10	285±98
82	169,0±1,5	96,0±0,5	100,0±0,2	160,0±0,5	14,5±0,8	14,5±0,8	7,68±0,09	1,20±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	7,08±0,60	4,23±0,07	1167±132	4420±660	6,90±0,07	310±43
83	64,2±9,3	87,5±0,9	93,1±1,2	136,0±5,3	16,8±0,2	16,8±0,2	7,17±0,11	1,14±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	5,65±0,00	3,15±0,00	384±115	1021±260	7,09±0,18	235±79
84	81,8±14,8	81,0±14,0	85,8±12,8	143,0±22,0	11,8±0,8	12,3±0,3	6,51±0,12	1,19±0,01	4,97±0,00	2,78±0,00	7,47±0,00	4,88±0,00	715±495	2230±1750	6,75±0,25	433±353
85	90,0±3,0	102,5±4,3	111,5±6,2	174,0±1,7	12,5±0,8	13,5±1,3	7,80±0,79	1,24±0,09	4,21±0,34	2,44±0,05	6,17±0,33	3,45±0,71	1137±334	3360±1114	7,05±0,14	629±141
86	57,8±4,1	89,0±3,0	95,7±3,1	137,5±3,3	15,0±0,9	15,0±0,9	6,47±0,07	1,11±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	5,79±0,20	2,69±0,20	381±183	834±137	6,77±0,09	168±1
87	135,5±28,5	97,0±9,8	99,0±7,7	162,0±2,4	13,3±1,2	13,3±1,2	7,89±0,16	1,25±0,09	5,44±0,48	3,00±0,85	8,12±0,26	4,84±0,62	1000±394	4675±2043	6,90±0,33	704±242
88	104,0±11,8	96,0±0,9	100,3±0,6	163,5±0,6	12,8±1,0	12,8±1,0	6,68±0,20	1,18±0,01	5,02±1,04	2,48±0,74	6,72±1,68	3,87±0,83	1352±149	4260±205	7,00±0,02	779±140
90	153,3±7,4	98,0±0,9	100,8±1,5	162,0±2,9	18,0±0,3	18,0±0,3	6,83±0,37	1,21±0,10	5,43±0,46	3,60±0,40	7,30±0,28	5,09±0,44	925±102	3750±1184	7,10±0,08	605±131
91	136,8±14,9	99,0±6,2	103,6±6,7	163,5±0,6	14,8±0,8	14,8±0,8	7,58±0,17	1,40±0,03	4,54±0,48	2,65±0,07	6,65±0,21	3,79±0,01	970±42	3830±106	7,05±0,28	584±11
92	99,0±5,5	88,0±2,0	93,5±0,5	155,5±0,5	14,5±1,2	14,5±1,2	7,39±0,26	1,26±0,04	3,80±0,00	1,80±0,00	5,70±0,00	3,15±0,00	950±230	3737±544	6,45±0,15	680±47
93	48,9±3,9	88,0±4,2	94,5±3,3	145,5±1,5	12,8±0,5	12,8±0,5	7,47±0,18	1,39±0,05	894±309	2980±1486	7,81±0,42	365±110
94	167,0±10,1	100,5±2,0	105,5±3,8	158,5±0,6	15,3±1,0	15,3±1,0	7,75±0,18	1,31±0,02	4,41±0,06	2,68±0,49	6,45±0,00	3,59±0,34	1435±11	5650±82	7,25±0,37	646±106
95	95,0±1,6	85,0±2,5	94,7±0,7	160,0±1,5	9,7±1,8	9,7±1,8	8,11±0,22	1,39±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	5,89±0,16	2,79±0,37	742±121	2469±548	7,00±0,34	411±190
96	103,5±17,9	99,0±2,9	102,7±1,3	144,5±1,5	18,7±3,2	18,7±3,2	6,55±0,32	1,27±0,08	1307±504	4184±1947	7,36±0,33	731±374
97	53,4±0,3	94,0±3,0	110,0±2,3	138,5±0,5	16,7±0,7	16,7±0,7	7,67±0,07	1,16±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	6,75±0,49	3,95±0,25	322±155	1264±595	6,23±0,20	187±93
98	53,8±4,2	74,5±0,5	77,1±1,4	133,5±2,5	9,5±0,5	9,8±0,8	6,01±0,24	1,25±0,00	4,80±0,00	3,17±0,00	6,53±0,00	3,92±0,00	171±24	497±22	6,94±0,12	81±7
99	102,2±0,6	112,5±2,2	116,3±3,2	160,0±11,4	23,8±1,4	23,8±1,4	5,65±0,44	0,98±0,04	4,35±0,88	1,97±0,37	6,22±0,87	3,28±0,71	1272±849	2989±1942	5,90±0,22	292±178
100	64,5±28,3	80,5±0,9	84,5±1,6	144,0±0,9	8,3±0,7	8,9±0,5	9,40±0,37	1,64±0,03	5,52±0,78	3,60±0,53	8,40±0,64	5,13±0,42	134±18	489±80	9,13±0,15	128±99
101	84,2±10,7	87,5±3,1	93,3±2,6	144,0±2,6	14,0±0,4	14,0±0,4	9,55±0,14	1,78±0,08	5,48±0,98	3,50±0,33	8,26±0,93	5,24±0,98	280±69	1142±495	9,53±0,41	311±55
102	26,5±12,1	76,5±8,2	81,8±6,1	138,5±4,8	6,3±1,5	6,3±1,5	6,92±0,72	1,30±0,05	3,94±0,02	2,58±0,32	5,29±0,02	3,27±0,23	450±108	1817±552	8,05±0,34	276±79

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
103	78,2±5,4	89,0±5,9	94,5±4,2	137,5±4,9	14,2±0,8	14,2±0,8	7,42±0,39	1,12±0,02	4,95±0,03	3,15±0,11	6,15±0,04	4,08±0,29	1369±320	4676±955	6,48±0,13	587±117
104	49,0±10,9	97,5±1,2	100,7±1,5	146,0±1,8	13,7±1,6	13,4±1,6	7,44±0,33	1,24±0,02	4,87±1,25	2,41±0,51	6,35±1,77	4,09±1,15	950±385	4270±1605	6,62±0,09	561±71
105	72,2±13,2	69,0±1,0	73,8±0,2	138,5±1,5	7,0±0,7	7,7±0,3	7,35±0,58	1,28±0,01	4,80±0,00	3,65±0,00	6,37±0,00	4,13±0,00	770±115	3240±472	7,26±0,28	416±87
106	53,7±3,7	90,5±6,5	95,5±6,5	141,0±5,0	11,7±0,3	11,8±0,2	7,62±0,04	1,36±0,06	5,75±0,00	3,37±0,00	7,85±0,00	5,02±0,00	735±55	354±94	7,74±0,16	80±3
107	37,7±3,7	76,5±7,0	79,3±6,0	137,5±1,5	9,2±1,3	9,2±1,3	7,30±0,40	1,51±0,04	3,73±0,57	2,69±0,33	5,47±0,80	3,28±0,49	247±9	782±53	8,44±0,60	181±71
108	63,8±17,1	93,5±1,5	98,5±2,5	140,0±7,5	16,0±0,9	16,0±0,9	5,89±0,07	1,10±0,09	4,75±0,17	2,31±0,01	6,57±0,90	3,16±0,08	1117±285	3714±1198	6,82±0,16	371±168
109	40,0±10,0	105,0±13,5	108,0±9,9	137,0±22,0	14,0±0,0	14,0±0,2	2,35±0,28	0,70±0,05	2,65±0,00	1,88±0,00	3,87±0,00	2,42±0,00	353±375	853±833	3,80±0,29	32±16
110	31,8±7,2	105,0±4,0	108,7±4,3	141,5±0,5	12,0±0,0	12,7±0,3	2,64±0,39	0,74±0,06	2,27±0,00	1,08±0,00	3,48±0,00	1,57±0,00	75±0	160±0	3,80±0,10	28,6±0
111	101,9±5,6	90,0±7,4	95,7±10,1	139,5±9,0	17,8±2,2	17,8±1,8	5,89±0,04	1,26±0,04	6,30±0,57	2,71±0,41	7,35±0,78	3,15±0,54	1370±228	4335±1073	7,23±0,38	631±141
112	39,0±9,3	85,5±2,4	91,8±2,8	141,0±3,4	10,8±1,0	10,8±0,9	7,48±0,12	1,14±0,02	5,54±0,52	3,47±0,33	9,17±0,00	5,61±0,08	427±52	2075±325	7,84±0,28	227±15
113	55,8±4,2	86,0±0,8	90,0±0,8	146,0±0,8	12,8±1,0	12,8±1,0	7,10±0,14	1,17±0,03	5,79±0,30	3,64±0,08	8,88±0,95	5,52±0,73	542±30	2006±239	7,56±0,09	415±109
114	98,7±5,0	79,0±2,0	84,0±1,7	140,0±6,0	12,0±0,3	12,0±0,3	9,20±0,0	1,65±0,02	5,88±0,00	4,55±0,00	6,95±0,00	6,00±0,00	312±11	1432±14	9,55±0,38	322±9
115	69,4±12,3	71,5±5,3	74,7±5,5	139,0±6,6	8,7±0,5	8,7±0,5	5,83±0,31	1,23±0,04	4,15±0,33	2,85±0,25	5,79±0,86	3,33±0,57	204±44	783±136	6,60±0,19	113±35
116	28,7±3,6	75,0±2,9	77,7±3,5	140,5±2,1	6,8±0,4	6,8±0,4	9,44±0,48	1,60±0,06	3,16±0,13	2,49±0,06	4,32±0,12	2,74±0,09	103±35	454±150	7,97±0,10	110±46
117	47,0±11,9	81,5±2,4	86,5±2,9	146,5±2,1	11,0±0,4	11,0±0,5	7,25±0,17	1,10±0,03	4,64±0,13	2,51±0,06	7,18±0,46	3,55±0,21	1302±254	6280±1434	5,88±0,05	698±44
118	95,3±3,4	102,5±0,6	106,0±0,4	140,0±1,2	14,0±0,3	14,0±0,3	8,61±0,11	1,64±0,03	6,58±0,00	4,20±0,00	10,50±0,35	6,40±0,00	458±171	1845±635	7,61±0,25	301±33
119	58,0±13,8	97,5±5,7	101,7±6,9	143,0±4,4	13,2±0,6	13,2±0,6	8,08±0,36	1,32±0,05	6,39±0,76	3,84±0,41	8,89±0,69	5,24±0,16	442±163	1794±941	7,49±0,41	247±110
120	58,8±6,1	89,5±2,0	93,3±2,2	141,0±5,2	14,5±1,7	14,5±1,7	7,09±0,28	1,34±0,06	5,88±0,78	3,46±0,53	8,04±0,48	4,65±0,00	755±207	2665±874	7,26±0,27	611±233
121	49,5±4,1	86,0±0,4	91,8±1,6	136,0±1,7	13,3±0,6	13,3±0,6	6,73±0,46	1,26±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	6,51±0,13	3,47±0,19	419±69	891±158	6,91±0,12	122±24
122	130,8±3,9	100,0±1,7	105,8±1,7	156,5±1,8	17,8±0,5	18,5±0,9	7,34±0,23	1,20±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	5,63±0,42	3,24±0,40	1696±123	8234±585	6,93±0,21	871±84
210	152,3±19,2	98,5±0,6	101,5±0,9	158,5±2,1	14,8±1,1	14,8±1,1	6,14±0,07	1,10±0,01	4,17±0,16	2,38±0,04	6,19±0,23	3,58±0,35	1720±288	6690±867	6,35±0,29	813±151
211	142,8±12,3	89,0±14,7	94,3±14,1	142,5±15,1	13,0±1,3	13,0±1,3	5,74±0,39	1,08±0,04	4,61±0,25	2,58±0,30	6,81±0,61	3,95±0,31	873±600	2905±2342	5,88±0,31	391±285
280	139,3±14,8	87,5±8,7	92,3±8,6	174,0±1,6	11,8±0,3	11,8±0,3	8,37±0,24	1,64±0,02	3,97±1,08	2,43±0,39	6,55±1,34	3,48±0,84	895±416	3240±1168	7,60±0,22	553±177
281	139,5±7,6	102,0±2,5	104,7±3,0	164,5±1,7	11,8±0,7	11,8±0,7	7,97±0,61	1,42±0,04	5,57±0,42	3,20±0,24	8,98±0,21	4,94±0,08	935±177	3400±191	7,50±0,26	583±75

Ac.	AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV	LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
400	174,0±10,1	92,0±1,8	98,8±2,0	167,0±0,0	10,3±1,0	10,3±1,0	7,49±0,10	1,17±0,04	4,77±0,52	2,36±0,32	6,48±0,99	3,31±0,32	980±229	4260±343	6,20±0,13	810±211
401	150,8±21,0	94,0±1,2	98,0±0,7	153,0±1,6	15,5±0,8	15,5±0,7	7,64±0,25	1,19±0,01	3,04±0,01	1,72±0,12	4,84±0,33	2,62±0,21	712±154	3917±561	5,75±0,11	711±83
481 (48)	102,5±18,9	83,0±12,4	87,3±12,4	134,0±16,3	14,0±0,8	14,0±0,8	5,09±0,20	0,84±0,06	3,54±0,23	1,69±0,01	4,68±0,21	2,38±0,13	1179±362	5709±1613	4,15±0,14	234±12
482 (48)	95,8±1,6	84,5±12,7	88,0±12,7	137,5±19,2	13,0±1,7	13,0±1,7	4,87±0,45	0,74±0,10	3,87±0,21	1,94±0,22	5,43±0,57	2,56±0,25	1915±589	7160±2351	4,45±0,20	227±102
510	159,3±28,6	94,5±11,2	98,5±22,6	156,0±33,9	14,0±1,6	14,0±1,6	5,00±1,41	1,01±0,18	4,14±1,05	1,97±0,49	5,19±0,28	2,64±0,03	1585±979	4048±2656	5,75±0,55	296±195
511	160,5±6,4	104,0±4,2	107,7±2,3	174,5±4,6	11,8±0,7	11,8±0,7	6,23±0,86	1,05±0,12	4,08±0,25	2,22±0,45	5,24±0,86	2,59±0,65	2519±986	7104±3086	6,15±0,28	885±255
890	136,0±49,0	96,0±1,0	99,5±1,0	160,5±0,5	16,5±4,5	16,5±4,5	7,46±0,18	1,23±0,00	5,28±0,00	3,38±0,00	7,22±0,00	4,52±0,00	1205±155	5779±569	7,25±0,25	914±39
891	69,0±0,0	95,0±0,0	99,0±0,0	163,0±0,0	11,5±0,0	11,5±0,0	8,10±0,00	1,15±0,00	5,28±sd	3,38±sd	7,22±sd	4,52±0,00	730±0	3490±0	7,33±0,00	573±0
Rango	26,5-220,5	47,0-148,0	53,7-151,0	111,5-190	6,3-31,0	6,3-31,0	2,35-9,55	0,58-1,77	0,00-6,58	0,00-4,55	3,48-10,50	1,57-6,40	72-4093	160-9807	3,60-9,53	4-1001
μ	105,0	93,8	98,7	154,9	13,7	13,8	6,87	1,22	3,88	2,20	6,48	3,62	1037	3594	6,61	432
CV%	40,5	16,4	15,5	10,2	31,2	31,0	19,3	18,2	43,9	46,4	19,6	24,1	67,7	59,6	17,7	54,6

Tabla 4: Matriz de correlación entre las variables cuantitativas.

	DF	DV	PNF	NPV	DC	AP	LV	AV	DG	NV	NG	PG	LH	AH	LE	AE
DF	1,00															
DV	0,99	1,00														
PNF	0,68	0,67	1,00													
NPV	0,68	0,68	0,99	1,00												
DC	0,71	0,72	0,23	0,24	1,00											
AP	0,34	0,35	0,40	0,41	0,43	1,00										
LV	-0,36	-0,36	-0,41	-0,43	0,02	-0,08	1,00									
AV	-0,39	-0,40	-0,41	-0,42	-0,04	-0,06	0,89	1,00								
DG	-0,37	-0,38	-0,37	-0,38	-0,08	-0,13	0,83	0,88	1,00							
NV	0,51	0,53	0,45	0,45	0,53	0,53	-0,40	-0,43	-0,43	1,00						
NG	0,44	0,45	0,39	0,39	0,52	0,57	-0,27	-0,36	-0,38	0,93	1,00					
PG	0,07	0,07	0,05	0,06	0,37	0,43	0,28	0,19	0,26	0,36	0,54	1,00				
LH	-0,01	-0,02	-0,05	-0,06	0,06	0,18	0,07	0,16	0,13	0,15	0,16	0,13	1,00			
AH	-0,10	-0,12	-0,16	-0,16	-0,01	0,09	0,22	0,31	0,29	-0,01	0,01	0,09	0,94	1,00		
LE	0,03	0,03	0,07	0,06	0,09	0,16	0,28	0,27	0,27	0,17	0,28	0,27	0,50	0,47	1,00	
AE	-0,08	-0,10	-0,04	-0,05	-0,04	0,05	0,45	0,43	0,13	-0,09	-0,01	0,18	0,50	0,59	0,88	1,00

Tabla 5: Matriz de distancias de Gower entre cada par de accesiones de la colección activa obtenida a partir de los descriptores cuantitativos y cualitativos. En verde se indican los valores mínimos de distancia y en amarillo los valores máximos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	25	26	27	29	30	31	32		
1	0																														
2	0.54	0																													
3	0.65	0.61	0																												
4	0.39	0.53	0.58	0																											
5	0.51	0.5	0.52	0.36	0																										
6	0.51	0.54	0.57	0.46	0.45	0																									
7	0.48	0.52	0.53	0.37	0.28	0.44	0																								
8	0.57	0.49	0.53	0.51	0.4	0.47	0.45	0																							
9	0.46	0.5	0.58	0.35	0.34	0.33	0.35	0.5	0																						
10	0.5	0.49	0.54	0.41	0.28	0.44	0.37	0.4	0.39	0																					
11	0.49	0.47	0.54	0.39	0.2	0.45	0.25	0.39	0.35	0.29	0																				
12	0.49	0.47	0.54	0.42	0.29	0.46	0.38	0.39	0.41	0.2	0.31	0																			
13	0.46	0.49	0.59	0.39	0.4	0.27	0.38	0.49	0.25	0.39	0.39	0.41	0																		
14	0.46	0.5	0.59	0.36	0.32	0.49	0.39	0.41	0.44	0.3	0.3	0.31	0.44	0																	
15	0.53	0.44	0.55	0.46	0.42	0.41	0.47	0.3	0.45	0.41	0.41	0.41	0.45	0.43	0																
16	0.59	0.53	0.53	0.53	0.39	0.38	0.4	0.32	0.44	0.42	0.39	0.42	0.44	0.44	0.37	0															
17	0.59	0.52	0.59	0.59	0.59	0.65	0.6	0.55	0.62	0.6	0.58	0.58	0.65	0.62	0.52	0.63	0														
18	0.54	0.48	0.52	0.48	0.45	0.44	0.51	0.33	0.48	0.43	0.45	0.42	0.45	0.46	0.26	0.41	0.54	0													
19	0.49	0.47	0.5	0.52	0.5	0.48	0.53	0.51	0.47	0.53	0.49	0.52	0.46	0.54	0.47	0.52	0.52	0.44	0												
20	0.67	0.63	0.51	0.66	0.57	0.5	0.58	0.56	0.59	0.59	0.57	0.58	0.55	0.6	0.59	0.49	0.64	0.58	0.52	0											
22	0.59	0.47	0.56	0.53	0.51	0.56	0.56	0.5	0.59	0.47	0.51	0.46	0.59	0.43	0.51	0.53	0.6	0.52	0.55	0.58	0										
24	0.55	0.45	0.56	0.48	0.43	0.38	0.44	0.35	0.43	0.44	0.41	0.44	0.43	0.47	0.24	0.31	0.55	0.35	0.49	0.57	0.53	0									
25	0.56	0.44	0.43	0.49	0.45	0.45	0.48	0.43	0.45	0.52	0.45	0.52	0.47	0.53	0.38	0.44	0.53	0.38	0.37	0.51	0.53	0.38	0								
26	0.47	0.55	0.54	0.35	0.45	0.46	0.44	0.41	0.46	0.52	0.46	0.53	0.49	0.45	0.37	0.45	0.56	0.4	0.52	0.63	0.55	0.4	0.41	0							
27	0.66	0.57	0.44	0.6	0.5	0.58	0.54	0.45	0.58	0.54	0.5	0.53	0.6	0.57	0.49	0.49	0.48	0.46	0.5	0.48	0.56	0.52	0.39	0.53	0						
29	0.6	0.61	0.44	0.61	0.56	0.57	0.55	0.54	0.59	0.58	0.55	0.57	0.59	0.59	0.57	0.54	0.57	0.55	0.44	0.46	0.59	0.58	0.48	0.59	0.43	0					
30	0.61	0.6	0.46	0.52	0.52	0.61	0.53	0.49	0.61	0.57	0.53	0.57	0.62	0.52	0.52	0.53	0.49	0.53	0.53	0.51	0.5	0.55	0.46	0.45	0.38	0.45	0				
31	0.52	0.54	0.48	0.38	0.39	0.38	0.39	0.42	0.38	0.46	0.4	0.47	0.41	0.48	0.37	0.4	0.58	0.36	0.47	0.56	0.57	0.36	0.36	0.32	0.5	0.52	0.51	0			
32	0.55	0.47	0.55	0.5	0.47	0.46	0.52	0.34	0.49	0.47	0.46	0.46	0.47	0.48	0.31	0.42	0.49	0.32	0.47	0.59	0.54	0.37	0.38	0.41	0.44	0.57	0.52	0.42	0		
33	0.66	0.56	0.31	0.6	0.51	0.59	0.55	0.45	0.61	0.53	0.53	0.51	0.61	0.56	0.49	0.5	0.56	0.44	0.47	0.54	0.53	0.53	0.41	0.54	0.38	0.44	0.45	0.51	0.48		
34	0.67	0.53	0.51	0.59	0.56	0.53	0.59	0.48	0.56	0.58	0.57	0.58	0.55	0.59	0.45	0.49	0.45	0.44	0.5	0.47	0.58	0.46	0.39	0.5	0.37	0.54	0.43	0.48	0.4		
35	0.51	0.48	0.55	0.47	0.45	0.42	0.47	0.39	0.42	0.49	0.43	0.48	0.44	0.49	0.34	0.4	0.52	0.35	0.39	0.56	0.54	0.37	0.36	0.41	0.46	0.5	0.5	0.38	0.31		
36	0.65	0.57	0.38	0.58	0.48	0.55	0.53	0.48	0.56	0.5	0.49	0.51	0.58	0.56	0.49	0.49	0.51	0.48	0.48	0.45	0.52	0.51	0.42	0.53	0.31	0.43	0.37	0.5	0.5		
37	0.59	0.47	0.45	0.52	0.48	0.55	0.54	0.48	0.51	0.52	0.5	0.51	0.53	0.55	0.42	0.52	0.43	0.41	0.38	0.59	0.56	0.47	0.36	0.48	0.43	0.55	0.46	0.47	0.4		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	25	26	27	29	30	31	32
38	0.68	0.64	0.46	0.64	0.65	0.66	0.67	0.63	0.66	0.65	0.66	0.64	0.67	0.69	0.59	0.67	0.48	0.54	0.52	0.6	0.64	0.63	0.53	0.61	0.48	0.45	0.5	0.56	0.55
39	0.69	0.68	0.55	0.63	0.62	0.57	0.65	0.62	0.63	0.6	0.64	0.61	0.62	0.6	0.64	0.56	0.69	0.62	0.61	0.44	0.55	0.62	0.57	0.63	0.53	0.51	0.5	0.62	0.65
41	0.68	0.57	0.47	0.62	0.52	0.51	0.55	0.49	0.57	0.54	0.53	0.55	0.55	0.56	0.53	0.46	0.65	0.52	0.52	0.4	0.53	0.53	0.46	0.57	0.5	0.56	0.52	0.51	0.53
42	0.69	0.59	0.47	0.61	0.52	0.5	0.55	0.51	0.56	0.52	0.52	0.53	0.54	0.55	0.55	0.48	0.66	0.54	0.55	0.39	0.52	0.54	0.48	0.59	0.52	0.57	0.54	0.51	0.55
43	0.68	0.62	0.39	0.64	0.59	0.67	0.63	0.52	0.68	0.59	0.6	0.58	0.68	0.59	0.56	0.59	0.5	0.51	0.53	0.54	0.54	0.61	0.5	0.58	0.35	0.44	0.36	0.59	0.53
44	0.71	0.66	0.43	0.65	0.59	0.67	0.62	0.58	0.67	0.61	0.61	0.61	0.68	0.64	0.59	0.61	0.5	0.57	0.57	0.53	0.6	0.63	0.53	0.61	0.39	0.43	0.43	0.57	0.56
45	0.71	0.67	0.44	0.66	0.6	0.67	0.63	0.59	0.68	0.62	0.62	0.61	0.69	0.65	0.6	0.62	0.5	0.57	0.56	0.54	0.61	0.64	0.54	0.62	0.42	0.43	0.44	0.58	0.58
46	0.7	0.67	0.46	0.66	0.61	0.68	0.64	0.59	0.68	0.62	0.62	0.61	0.7	0.65	0.61	0.63	0.5	0.57	0.57	0.56	0.61	0.65	0.55	0.63	0.42	0.44	0.45	0.59	0.58
47	0.71	0.66	0.38	0.65	0.6	0.62	0.62	0.56	0.66	0.62	0.61	0.63	0.66	0.62	0.6	0.56	0.66	0.56	0.56	0.53	0.59	0.61	0.5	0.58	0.48	0.54	0.51	0.57	0.58
49	0.7	0.6	0.42	0.64	0.58	0.63	0.63	0.51	0.66	0.57	0.59	0.57	0.65	0.57	0.55	0.56	0.55	0.51	0.56	0.52	0.54	0.58	0.51	0.58	0.38	0.49	0.4	0.59	0.52
50	0.76	0.71	0.45	0.69	0.65	0.68	0.66	0.62	0.71	0.67	0.66	0.67	0.71	0.67	0.64	0.61	0.63	0.61	0.63	0.49	0.64	0.66	0.56	0.62	0.44	0.53	0.48	0.63	0.61
53	0.46	0.53	0.55	0.39	0.38	0.26	0.4	0.44	0.3	0.43	0.39	0.44	0.32	0.47	0.39	0.39	0.61	0.42	0.42	0.53	0.55	0.37	0.39	0.4	0.54	0.53	0.57	0.32	0.44
54	0.52	0.6	0.57	0.4	0.49	0.52	0.51	0.51	0.52	0.55	0.52	0.53	0.54	0.49	0.45	0.52	0.6	0.44	0.54	0.63	0.55	0.48	0.48	0.35	0.57	0.6	0.49	0.39	0.5
55	0.47	0.54	0.51	0.34	0.44	0.45	0.44	0.45	0.45	0.51	0.45	0.5	0.48	0.44	0.39	0.44	0.57	0.4	0.5	0.6	0.52	0.38	0.38	0.27	0.51	0.55	0.43	0.3	0.43
56	0.56	0.56	0.61	0.45	0.49	0.46	0.53	0.44	0.5	0.52	0.5	0.51	0.49	0.45	0.38	0.43	0.64	0.42	0.56	0.6	0.53	0.39	0.46	0.37	0.59	0.65	0.53	0.42	0.44
57	0.54	0.56	0.51	0.41	0.37	0.43	0.43	0.37	0.47	0.39	0.39	0.39	0.45	0.31	0.41	0.36	0.65	0.41	0.55	0.53	0.43	0.41	0.45	0.38	0.49	0.56	0.45	0.4	0.44
58	0.51	0.49	0.52	0.43	0.39	0.42	0.45	0.32	0.42	0.45	0.4	0.45	0.44	0.46	0.27	0.4	0.52	0.26	0.44	0.59	0.55	0.34	0.34	0.33	0.45	0.55	0.5	0.31	0.31
59	0.52	0.56	0.51	0.42	0.37	0.49	0.44	0.36	0.49	0.43	0.39	0.42	0.51	0.36	0.39	0.38	0.6	0.39	0.52	0.57	0.45	0.43	0.43	0.35	0.44	0.53	0.39	0.41	0.42
60	0.55	0.46	0.51	0.48	0.34	0.42	0.38	0.27	0.46	0.35	0.32	0.34	0.45	0.36	0.29	0.3	0.58	0.37	0.51	0.53	0.46	0.31	0.41	0.44	0.46	0.52	0.49	0.41	0.38
61	0.53	0.48	0.52	0.5	0.39	0.45	0.44	0.26	0.48	0.38	0.37	0.35	0.47	0.39	0.34	0.34	0.57	0.32	0.48	0.54	0.47	0.37	0.42	0.45	0.47	0.51	0.52	0.42	0.39
62	0.5	0.5	0.57	0.48	0.45	0.43	0.47	0.38	0.42	0.48	0.42	0.46	0.44	0.49	0.33	0.39	0.53	0.31	0.41	0.59	0.55	0.36	0.38	0.4	0.48	0.52	0.53	0.35	0.35
63	0.57	0.5	0.49	0.47	0.33	0.4	0.39	0.27	0.45	0.36	0.34	0.35	0.44	0.38	0.33	0.26	0.6	0.35	0.5	0.5	0.48	0.32	0.39	0.42	0.44	0.52	0.48	0.37	0.37
64	0.58	0.53	0.49	0.49	0.35	0.47	0.41	0.29	0.47	0.43	0.36	0.42	0.5	0.44	0.35	0.33	0.54	0.39	0.5	0.56	0.53	0.36	0.39	0.4	0.39	0.52	0.44	0.39	0.35
65	0.55	0.5	0.46	0.47	0.34	0.39	0.39	0.29	0.44	0.36	0.35	0.35	0.42	0.38	0.34	0.3	0.61	0.36	0.49	0.49	0.47	0.36	0.39	0.43	0.46	0.52	0.49	0.37	0.39
66	0.52	0.45	0.57	0.43	0.4	0.36	0.44	0.33	0.41	0.39	0.38	0.39	0.4	0.41	0.23	0.35	0.56	0.3	0.46	0.56	0.5	0.25	0.37	0.39	0.52	0.56	0.54	0.33	0.33
67	0.52	0.46	0.57	0.48	0.45	0.36	0.46	0.32	0.42	0.46	0.43	0.45	0.38	0.46	0.28	0.33	0.57	0.32	0.43	0.55	0.54	0.28	0.38	0.41	0.53	0.54	0.55	0.37	0.36
68	0.54	0.49	0.5	0.45	0.32	0.4	0.36	0.37	0.41	0.33	0.32	0.32	0.39	0.37	0.4	0.33	0.6	0.43	0.48	0.5	0.49	0.38	0.43	0.47	0.49	0.54	0.53	0.41	0.43
69	0.56	0.61	0.57	0.5	0.47	0.44	0.48	0.47	0.5	0.49	0.47	0.49	0.48	0.43	0.49	0.4	0.71	0.51	0.56	0.52	0.51	0.47	0.51	0.48	0.57	0.58	0.53	0.49	0.54
70	0.59	0.59	0.54	0.47	0.44	0.44	0.45	0.42	0.49	0.48	0.44	0.48	0.49	0.4	0.46	0.37	0.66	0.46	0.56	0.52	0.49	0.44	0.47	0.41	0.48	0.58	0.47	0.43	0.46
71	0.53	0.49	0.54	0.5	0.38	0.42	0.4	0.29	0.46	0.36	0.35	0.35	0.45	0.37	0.33	0.31	0.59	0.35	0.47	0.52	0.45	0.35	0.45	0.47	0.5	0.5	0.52	0.41	0.41
72	0.58	0.61	0.54	0.48	0.44	0.49	0.46	0.46	0.5	0.51	0.44	0.51	0.53	0.44	0.49	0.41	0.68	0.51	0.56	0.56	0.53	0.46	0.47	0.44	0.53	0.58	0.49	0.46	0.53
73	0.59	0.54	0.48	0.47	0.33	0.36	0.39	0.36	0.43	0.36	0.36	0.37	0.43	0.39	0.39	0.32	0.63	0.42	0.53	0.48	0.47	0.38	0.44	0.45	0.48	0.55	0.52	0.37	0.42
74	0.56	0.49	0.51	0.47	0.43	0.35	0.47	0.37	0.42	0.44	0.44	0.44	0.42	0.47	0.29	0.37	0.59	0.32	0.49	0.54	0.54	0.31	0.37	0.39	0.5	0.59	0.55	0.35	0.37
75	0.59	0.58	0.51	0.51	0.4	0.48	0.45	0.42	0.48	0.43	0.42	0.42	0.51	0.47	0.43	0.41	0.63	0.45	0.54	0.57	0.52	0.45	0.47	0.49	0.52	0.56	0.53	0.44	0.51
76	0.56	0.61	0.56	0.46	0.43	0.48	0.45	0.46	0.49	0.49	0.44	0.5	0.52	0.42	0.49	0.45	0.67	0.51	0.56	0.56	0.51	0.49	0.49	0.42	0.55	0.58	0.49	0.46	0.52
77	0.57	0.56	0.62	0.46	0.5	0.46	0.53	0.44	0.5	0.52	0.5	0.52	0.5	0.46	0.38	0.42	0.64	0.43	0.57	0.61	0.53	0.37	0.48	0.37	0.59	0.66	0.55	0.43	0.44
78	0.55	0.51	0.49	0.45	0.32	0.4	0.39	0.3	0.44	0.31	0.34	0.29	0.42	0.36	0.33	0.32	0.6	0.34	0.51	0.51	0.44	0.36	0.43	0.45	0.45	0.52	0.49	0.38	0.38

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	25	26	27	29	30	31	32
79	0.6	0.5	0.5	0.53	0.49	0.51	0.54	0.5	0.51	0.54	0.49	0.52	0.54	0.55	0.43	0.51	0.43	0.46	0.47	0.5	0.54	0.44	0.38	0.48	0.41	0.5	0.41	0.46	0.45
80	0.61	0.51	0.48	0.55	0.51	0.53	0.56	0.47	0.53	0.56	0.52	0.55	0.55	0.57	0.43	0.51	0.43	0.41	0.42	0.48	0.56	0.47	0.33	0.48	0.34	0.47	0.37	0.44	0.42
81	0.63	0.58	0.49	0.52	0.41	0.44	0.46	0.41	0.49	0.42	0.43	0.42	0.47	0.46	0.43	0.39	0.67	0.43	0.54	0.5	0.52	0.43	0.46	0.51	0.49	0.56	0.54	0.43	0.48
82	0.57	0.51	0.57	0.51	0.47	0.44	0.53	0.39	0.49	0.49	0.49	0.48	0.47	0.5	0.33	0.44	0.6	0.34	0.49	0.58	0.57	0.38	0.42	0.44	0.54	0.6	0.57	0.4	0.4
83	0.56	0.56	0.59	0.44	0.49	0.43	0.52	0.48	0.48	0.51	0.5	0.51	0.48	0.45	0.41	0.44	0.65	0.44	0.56	0.59	0.52	0.4	0.45	0.41	0.58	0.64	0.54	0.43	0.47
84	0.52	0.53	0.51	0.48	0.37	0.43	0.39	0.35	0.42	0.4	0.34	0.38	0.45	0.42	0.4	0.33	0.6	0.38	0.45	0.53	0.49	0.4	0.43	0.46	0.48	0.47	0.51	0.37	0.44
85	0.59	0.51	0.49	0.48	0.34	0.43	0.41	0.27	0.47	0.35	0.35	0.34	0.46	0.39	0.29	0.28	0.59	0.33	0.52	0.53	0.48	0.32	0.42	0.41	0.44	0.54	0.48	0.38	0.37
86	0.63	0.57	0.51	0.53	0.41	0.44	0.45	0.37	0.5	0.44	0.42	0.44	0.48	0.46	0.4	0.34	0.65	0.41	0.56	0.51	0.53	0.41	0.45	0.48	0.48	0.58	0.52	0.43	0.45
87	0.55	0.49	0.53	0.51	0.4	0.48	0.46	0.24	0.51	0.39	0.39	0.37	0.5	0.4	0.3	0.34	0.55	0.32	0.49	0.57	0.48	0.37	0.45	0.43	0.47	0.52	0.5	0.43	0.35
88	0.55	0.45	0.53	0.46	0.43	0.41	0.48	0.32	0.45	0.43	0.43	0.43	0.43	0.45	0.24	0.36	0.52	0.28	0.44	0.55	0.5	0.29	0.35	0.4	0.47	0.54	0.5	0.36	0.26
90	0.53	0.46	0.54	0.49	0.46	0.45	0.51	0.34	0.48	0.46	0.46	0.44	0.47	0.46	0.27	0.41	0.54	0.26	0.43	0.61	0.52	0.34	0.39	0.42	0.51	0.54	0.54	0.4	0.33
91	0.53	0.44	0.53	0.45	0.41	0.4	0.47	0.29	0.44	0.41	0.41	0.4	0.43	0.44	0.16	0.37	0.54	0.25	0.45	0.58	0.51	0.25	0.36	0.37	0.48	0.56	0.51	0.35	0.31
92	0.53	0.47	0.5	0.44	0.4	0.38	0.42	0.38	0.38	0.47	0.39	0.46	0.41	0.48	0.31	0.34	0.55	0.35	0.44	0.55	0.56	0.27	0.31	0.35	0.47	0.54	0.5	0.3	0.36
93	0.6	0.54	0.53	0.5	0.34	0.41	0.42	0.28	0.46	0.35	0.35	0.34	0.46	0.38	0.33	0.25	0.64	0.35	0.53	0.51	0.47	0.34	0.44	0.46	0.5	0.55	0.54	0.37	0.41
94	0.54	0.45	0.55	0.47	0.43	0.42	0.48	0.3	0.45	0.44	0.43	0.44	0.45	0.46	0.21	0.38	0.53	0.27	0.47	0.59	0.54	0.27	0.36	0.37	0.47	0.58	0.51	0.38	0.29
95	0.54	0.56	0.6	0.43	0.48	0.41	0.5	0.5	0.46	0.5	0.48	0.51	0.46	0.43	0.44	0.46	0.66	0.47	0.56	0.58	0.52	0.42	0.47	0.4	0.6	0.64	0.56	0.43	0.47
96	0.62	0.54	0.52	0.55	0.41	0.47	0.47	0.2	0.52	0.41	0.41	0.39	0.51	0.44	0.29	0.28	0.6	0.29	0.53	0.56	0.51	0.35	0.44	0.43	0.45	0.58	0.52	0.43	0.35
97	0.59	0.61	0.52	0.48	0.44	0.54	0.5	0.45	0.54	0.49	0.47	0.49	0.56	0.44	0.48	0.46	0.65	0.46	0.56	0.57	0.49	0.5	0.48	0.44	0.5	0.58	0.46	0.47	0.51
98	0.46	0.47	0.58	0.4	0.39	0.31	0.41	0.42	0.32	0.36	0.38	0.38	0.28	0.4	0.37	0.41	0.58	0.38	0.41	0.55	0.52	0.38	0.43	0.46	0.57	0.55	0.59	0.38	0.41
99	0.64	0.56	0.27	0.57	0.47	0.56	0.53	0.46	0.56	0.5	0.49	0.5	0.58	0.55	0.49	0.48	0.58	0.45	0.44	0.51	0.51	0.51	0.36	0.53	0.37	0.45	0.45	0.48	0.48
100	0.38	0.47	0.65	0.38	0.45	0.53	0.48	0.52	0.44	0.46	0.43	0.45	0.48	0.39	0.47	0.56	0.55	0.49	0.5	0.69	0.52	0.5	0.52	0.46	0.62	0.64	0.6	0.51	0.51
101	0.42	0.45	0.67	0.41	0.48	0.52	0.51	0.51	0.48	0.45	0.46	0.43	0.47	0.37	0.45	0.55	0.57	0.47	0.53	0.69	0.5	0.48	0.53	0.49	0.64	0.66	0.61	0.53	0.49
102	0.54	0.5	0.56	0.41	0.29	0.4	0.3	0.43	0.32	0.31	0.29	0.32	0.33	0.35	0.45	0.38	0.65	0.48	0.54	0.56	0.52	0.43	0.5	0.51	0.55	0.59	0.58	0.43	0.5
103	0.47	0.51	0.55	0.39	0.45	0.48	0.5	0.39	0.48	0.49	0.44	0.49	0.5	0.42	0.34	0.46	0.55	0.33	0.46	0.62	0.51	0.39	0.38	0.29	0.48	0.56	0.45	0.39	0.37
104	0.52	0.49	0.52	0.42	0.38	0.41	0.43	0.36	0.4	0.43	0.38	0.42	0.43	0.45	0.29	0.39	0.54	0.29	0.42	0.56	0.53	0.32	0.33	0.37	0.46	0.53	0.49	0.29	0.35
105	0.49	0.51	0.57	0.42	0.4	0.37	0.42	0.4	0.38	0.46	0.39	0.46	0.39	0.46	0.35	0.43	0.58	0.36	0.43	0.58	0.55	0.37	0.39	0.38	0.53	0.54	0.56	0.34	0.41
106	0.47	0.49	0.56	0.4	0.25	0.48	0.33	0.42	0.39	0.3	0.25	0.28	0.43	0.31	0.44	0.45	0.57	0.46	0.49	0.6	0.49	0.46	0.49	0.5	0.53	0.55	0.56	0.44	0.48
107	0.45	0.49	0.62	0.3	0.41	0.4	0.42	0.51	0.33	0.39	0.41	0.41	0.33	0.35	0.45	0.49	0.63	0.49	0.55	0.63	0.5	0.43	0.51	0.43	0.62	0.65	0.58	0.45	0.49
108	0.55	0.48	0.51	0.44	0.27	0.46	0.38	0.36	0.41	0.3	0.31	0.29	0.4	0.34	0.39	0.36	0.6	0.39	0.49	0.53	0.5	0.41	0.44	0.49	0.47	0.54	0.51	0.41	0.42
109	0.66	0.61	0.53	0.61	0.52	0.45	0.54	0.53	0.51	0.52	0.53	0.53	0.5	0.56	0.56	0.46	0.72	0.56	0.56	0.41	0.56	0.54	0.5	0.6	0.55	0.52	0.6	0.51	0.57
110	0.69	0.62	0.52	0.62	0.54	0.5	0.56	0.54	0.55	0.53	0.55	0.53	0.54	0.58	0.56	0.49	0.72	0.56	0.59	0.44	0.56	0.55	0.51	0.62	0.55	0.56	0.6	0.53	0.57
111	0.6	0.53	0.48	0.54	0.42	0.49	0.48	0.28	0.52	0.41	0.43	0.41	0.5	0.44	0.32	0.35	0.58	0.3	0.5	0.55	0.51	0.38	0.41	0.45	0.41	0.52	0.49	0.42	0.37
112	0.47	0.52	0.62	0.41	0.38	0.52	0.44	0.44	0.48	0.38	0.37	0.37	0.46	0.24	0.48	0.48	0.63	0.48	0.53	0.62	0.47	0.5	0.55	0.48	0.59	0.6	0.54	0.51	0.51
113	0.48	0.44	0.61	0.42	0.38	0.46	0.44	0.43	0.41	0.36	0.37	0.35	0.4	0.38	0.36	0.46	0.54	0.37	0.47	0.62	0.52	0.4	0.47	0.48	0.57	0.61	0.59	0.44	0.4
114	0.46	0.47	0.69	0.43	0.49	0.53	0.5	0.51	0.49	0.47	0.46	0.48	0.48	0.39	0.45	0.55	0.6	0.49	0.56	0.7	0.54	0.47	0.55	0.47	0.65	0.68	0.62	0.53	0.51
115	0.52	0.52	0.56	0.43	0.44	0.29	0.44	0.43	0.35	0.42	0.43	0.44	0.3	0.47	0.39	0.41	0.63	0.39	0.49	0.52	0.54	0.37	0.42	0.44	0.56	0.57	0.58	0.37	0.41
116	0.5	0.59	0.58	0.39	0.38	0.43	0.4	0.5	0.39	0.42	0.4	0.43	0.45	0.38	0.52	0.46	0.66	0.56	0.57	0.6	0.51	0.5	0.53	0.46	0.58	0.62	0.54	0.47	0.57

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	25	26	27	29	30	31	32
117	0.48	0.55	0.55	0.37	0.47	0.49	0.47	0.43	0.48	0.52	0.46	0.51	0.5	0.44	0.38	0.46	0.55	0.39	0.5	0.62	0.53	0.41	0.41	0.27	0.51	0.55	0.42	0.34	0.4
118	0.52	0.43	0.56	0.5	0.47	0.57	0.52	0.54	0.5	0.47	0.46	0.46	0.53	0.5	0.47	0.58	0.48	0.47	0.42	0.64	0.53	0.51	0.45	0.55	0.55	0.59	0.57	0.53	0.5
119	0.52	0.49	0.57	0.45	0.33	0.5	0.41	0.41	0.45	0.29	0.34	0.26	0.43	0.33	0.43	0.44	0.59	0.43	0.5	0.59	0.48	0.46	0.52	0.54	0.55	0.57	0.57	0.48	0.47
120	0.54	0.48	0.58	0.49	0.46	0.45	0.51	0.38	0.49	0.44	0.45	0.41	0.47	0.45	0.29	0.43	0.55	0.32	0.49	0.61	0.52	0.35	0.44	0.44	0.54	0.58	0.57	0.42	0.36
121	0.57	0.62	0.57	0.47	0.45	0.44	0.49	0.45	0.5	0.43	0.47	0.45	0.49	0.41	0.48	0.42	0.7	0.5	0.6	0.57	0.48	0.47	0.53	0.46	0.58	0.61	0.54	0.47	0.53
122	0.66	0.58	0.54	0.58	0.47	0.51	0.5	0.38	0.55	0.5	0.48	0.49	0.53	0.52	0.42	0.39	0.62	0.46	0.57	0.57	0.58	0.42	0.48	0.5	0.49	0.59	0.54	0.49	0.44
210	0.56	0.5	0.51	0.48	0.43	0.46	0.49	0.35	0.46	0.5	0.45	0.49	0.47	0.52	0.3	0.4	0.52	0.31	0.45	0.59	0.59	0.32	0.32	0.36	0.43	0.55	0.5	0.33	0.32
211	0.56	0.42	0.47	0.51	0.49	0.43	0.53	0.43	0.47	0.49	0.49	0.48	0.44	0.5	0.39	0.45	0.55	0.36	0.34	0.47	0.47	0.41	0.3	0.48	0.46	0.48	0.5	0.4	0.39
280	0.51	0.42	0.54	0.45	0.4	0.38	0.44	0.35	0.42	0.41	0.39	0.4	0.42	0.43	0.25	0.37	0.54	0.32	0.48	0.57	0.52	0.28	0.37	0.38	0.5	0.57	0.54	0.36	0.32
281	0.53	0.4	0.53	0.51	0.47	0.51	0.52	0.45	0.5	0.45	0.46	0.44	0.5	0.47	0.37	0.5	0.43	0.4	0.39	0.57	0.47	0.43	0.41	0.5	0.52	0.57	0.52	0.49	0.39
400	0.51	0.49	0.52	0.44	0.39	0.42	0.45	0.33	0.42	0.46	0.4	0.46	0.44	0.47	0.3	0.41	0.52	0.3	0.44	0.59	0.56	0.33	0.33	0.33	0.45	0.55	0.51	0.31	0.31
401	0.64	0.47	0.42	0.58	0.47	0.48	0.49	0.39	0.54	0.5	0.47	0.49	0.52	0.51	0.43	0.38	0.58	0.44	0.46	0.45	0.48	0.43	0.37	0.49	0.42	0.51	0.45	0.48	0.44
481	0.65	0.62	0.44	0.6	0.54	0.54	0.52	0.54	0.56	0.59	0.53	0.58	0.57	0.6	0.57	0.48	0.63	0.56	0.5	0.42	0.58	0.55	0.46	0.55	0.48	0.45	0.49	0.48	0.57
482	0.67	0.61	0.47	0.61	0.51	0.53	0.54	0.52	0.55	0.57	0.51	0.57	0.56	0.59	0.56	0.46	0.56	0.55	0.49	0.37	0.57	0.54	0.44	0.57	0.35	0.4	0.43	0.5	0.53
510	0.65	0.58	0.4	0.57	0.52	0.56	0.54	0.48	0.58	0.56	0.53	0.56	0.59	0.54	0.52	0.47	0.53	0.5	0.5	0.38	0.52	0.53	0.4	0.51	0.31	0.42	0.29	0.48	0.51
511	0.66	0.52	0.46	0.58	0.47	0.51	0.52	0.37	0.56	0.49	0.49	0.48	0.54	0.52	0.44	0.4	0.53	0.43	0.52	0.51	0.51	0.45	0.38	0.49	0.35	0.54	0.47	0.48	0.37
890	0.54	0.47	0.57	0.5	0.47	0.46	0.52	0.31	0.49	0.46	0.46	0.45	0.48	0.47	0.25	0.4	0.51	0.29	0.46	0.61	0.53	0.3	0.41	0.41	0.51	0.56	0.53	0.41	0.31
891	0.51	0.46	0.57	0.44	0.4	0.39	0.46	0.36	0.43	0.39	0.39	0.38	0.42	0.4	0.28	0.38	0.54	0.3	0.46	0.58	0.49	0.31	0.4	0.42	0.52	0.56	0.55	0.35	0.33

	33	34	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	46	47	49	50	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
33	0																												
34	0.48	0																											
35	0.5	0.46	0																										
36	0.38	0.41	0.49	0																									
37	0.4	0.4	0.41	0.43	0																								
38	0.47	0.47	0.55	0.47	0.47	0																							
39	0.57	0.55	0.64	0.48	0.63	0.6	0																						
41	0.49	0.48	0.53	0.47	0.52	0.62	0.54	0																					
42	0.5	0.5	0.55	0.48	0.54	0.62	0.52	0.2	0																				
43	0.35	0.45	0.55	0.4	0.46	0.4	0.56	0.56	0.58	0																			
44	0.44	0.47	0.57	0.4	0.49	0.32	0.54	0.56	0.57	0.4	0																		
45	0.44	0.49	0.58	0.4	0.5	0.32	0.55	0.57	0.57	0.4	0.22	0																	
46	0.46	0.5	0.58	0.43	0.51	0.29	0.57	0.58	0.59	0.4	0.21	0.18	0																
47	0.36	0.54	0.59	0.47	0.52	0.57	0.51	0.5	0.52	0.47	0.53	0.54	0.56	0															
49	0.33	0.44	0.56	0.39	0.46	0.47	0.54	0.52	0.54	0.26	0.44	0.46	0.46	0.44	0														
50	0.43	0.5	0.63	0.44	0.56	0.52	0.53	0.53	0.54	0.43	0.48	0.49	0.51	0.35	0.4	0													

	33	34	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	46	47	49	50	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
53	0.56	0.53	0.34	0.52	0.5	0.62	0.61	0.54	0.54	0.64	0.63	0.64	0.65	0.63	0.62	0.68	0												
54	0.56	0.56	0.46	0.57	0.53	0.62	0.62	0.58	0.58	0.59	0.63	0.63	0.64	0.59	0.62	0.64	0.46	0											
55	0.52	0.51	0.4	0.51	0.48	0.59	0.58	0.56	0.56	0.57	0.59	0.6	0.61	0.56	0.57	0.62	0.39	0.31	0										
56	0.59	0.52	0.46	0.58	0.53	0.68	0.59	0.55	0.55	0.62	0.68	0.68	0.7	0.6	0.6	0.65	0.46	0.3	0.37	0									
57	0.49	0.52	0.46	0.48	0.53	0.65	0.51	0.48	0.47	0.55	0.59	0.6	0.61	0.53	0.51	0.59	0.42	0.43	0.35	0.37	0								
58	0.46	0.46	0.31	0.48	0.39	0.56	0.65	0.52	0.54	0.54	0.57	0.58	0.59	0.58	0.54	0.63	0.35	0.42	0.36	0.41	0.4	0							
59	0.46	0.52	0.4	0.46	0.47	0.61	0.56	0.52	0.53	0.5	0.55	0.56	0.57	0.54	0.5	0.58	0.44	0.4	0.32	0.4	0.26	0.35	0						
60	0.46	0.5	0.39	0.46	0.48	0.63	0.59	0.48	0.48	0.54	0.58	0.59	0.59	0.57	0.52	0.62	0.4	0.5	0.41	0.43	0.34	0.37	0.33	0					
61	0.45	0.52	0.41	0.48	0.5	0.62	0.61	0.49	0.51	0.52	0.58	0.59	0.58	0.57	0.52	0.63	0.42	0.5	0.45	0.46	0.37	0.35	0.37	0.26	0				
62	0.51	0.48	0.24	0.52	0.43	0.56	0.66	0.55	0.57	0.54	0.58	0.59	0.59	0.6	0.58	0.65	0.35	0.45	0.4	0.45	0.46	0.27	0.38	0.39	0.36	0			
63	0.44	0.48	0.38	0.45	0.48	0.62	0.57	0.45	0.46	0.53	0.56	0.57	0.58	0.55	0.51	0.6	0.38	0.47	0.38	0.41	0.29	0.35	0.31	0.2	0.27	0.38	0		
64	0.45	0.46	0.35	0.42	0.43	0.59	0.61	0.5	0.52	0.52	0.52	0.53	0.54	0.53	0.51	0.57	0.41	0.48	0.4	0.46	0.37	0.34	0.3	0.29	0.34	0.35	0.27	0	
65	0.45	0.48	0.41	0.42	0.49	0.62	0.55	0.43	0.44	0.55	0.56	0.57	0.58	0.52	0.51	0.59	0.38	0.49	0.4	0.43	0.28	0.37	0.34	0.24	0.27	0.41	0.22	0.29	0
66	0.52	0.47	0.33	0.52	0.47	0.6	0.62	0.52	0.52	0.59	0.61	0.63	0.63	0.61	0.57	0.66	0.34	0.45	0.37	0.37	0.4	0.3	0.4	0.29	0.32	0.32	0.29	0.38	0.33
67	0.53	0.47	0.31	0.54	0.47	0.62	0.63	0.53	0.55	0.6	0.63	0.64	0.64	0.62	0.58	0.67	0.33	0.48	0.41	0.39	0.43	0.32	0.42	0.33	0.34	0.3	0.34	0.38	0.36
68	0.49	0.52	0.43	0.46	0.49	0.65	0.56	0.45	0.45	0.59	0.59	0.6	0.61	0.56	0.55	0.62	0.39	0.52	0.45	0.46	0.33	0.43	0.4	0.29	0.34	0.44	0.29	0.37	0.24
69	0.57	0.59	0.5	0.55	0.6	0.71	0.52	0.51	0.51	0.61	0.65	0.66	0.68	0.56	0.58	0.63	0.44	0.41	0.43	0.34	0.34	0.51	0.41	0.41	0.44	0.51	0.41	0.46	0.38
70	0.51	0.5	0.45	0.51	0.55	0.66	0.52	0.47	0.47	0.55	0.6	0.61	0.62	0.51	0.53	0.56	0.46	0.45	0.4	0.42	0.29	0.45	0.35	0.4	0.43	0.47	0.36	0.4	0.38
71	0.48	0.54	0.37	0.49	0.52	0.63	0.61	0.5	0.5	0.54	0.59	0.6	0.59	0.59	0.55	0.64	0.4	0.5	0.45	0.45	0.36	0.38	0.38	0.25	0.21	0.35	0.27	0.36	0.29
72	0.55	0.59	0.49	0.51	0.56	0.69	0.54	0.52	0.52	0.59	0.63	0.64	0.66	0.53	0.58	0.59	0.47	0.36	0.39	0.34	0.36	0.48	0.36	0.42	0.45	0.49	0.41	0.42	0.4
73	0.49	0.49	0.44	0.44	0.53	0.65	0.54	0.42	0.41	0.57	0.58	0.59	0.61	0.53	0.54	0.58	0.38	0.48	0.43	0.44	0.29	0.41	0.39	0.31	0.35	0.46	0.28	0.36	0.26
74	0.51	0.45	0.42	0.48	0.46	0.61	0.58	0.48	0.48	0.59	0.61	0.62	0.63	0.54	0.56	0.6	0.38	0.47	0.39	0.39	0.39	0.33	0.44	0.36	0.36	0.4	0.36	0.4	0.3
75	0.51	0.58	0.47	0.48	0.52	0.64	0.59	0.52	0.51	0.57	0.6	0.6	0.61	0.56	0.58	0.63	0.44	0.4	0.47	0.4	0.42	0.42	0.42	0.38	0.38	0.45	0.39	0.4	0.35
76	0.56	0.59	0.46	0.51	0.57	0.68	0.58	0.52	0.53	0.59	0.63	0.64	0.65	0.55	0.59	0.63	0.44	0.36	0.43	0.35	0.36	0.46	0.36	0.43	0.46	0.48	0.42	0.43	0.41
77	0.6	0.52	0.47	0.58	0.54	0.68	0.61	0.56	0.56	0.63	0.68	0.69	0.7	0.61	0.61	0.66	0.46	0.32	0.39	0.16	0.39	0.42	0.41	0.43	0.47	0.46	0.42	0.47	0.45
78	0.45	0.5	0.41	0.45	0.49	0.62	0.56	0.47	0.46	0.54	0.56	0.57	0.58	0.56	0.51	0.61	0.37	0.47	0.4	0.43	0.28	0.35	0.32	0.23	0.27	0.4	0.21	0.32	0.22
79	0.5	0.36	0.43	0.37	0.41	0.49	0.58	0.52	0.53	0.47	0.48	0.51	0.51	0.6	0.46	0.56	0.46	0.54	0.47	0.54	0.51	0.42	0.48	0.46	0.49	0.46	0.47	0.45	0.47
80	0.44	0.28	0.39	0.38	0.35	0.44	0.56	0.49	0.52	0.4	0.45	0.46	0.47	0.54	0.43	0.52	0.48	0.52	0.46	0.52	0.52	0.38	0.46	0.48	0.49	0.41	0.46	0.45	0.48
81	0.49	0.53	0.49	0.47	0.54	0.65	0.54	0.46	0.44	0.57	0.59	0.6	0.61	0.52	0.55	0.59	0.45	0.41	0.46	0.38	0.36	0.45	0.42	0.37	0.4	0.49	0.34	0.4	0.31
82	0.52	0.5	0.43	0.53	0.49	0.62	0.63	0.51	0.54	0.59	0.63	0.64	0.64	0.57	0.58	0.64	0.43	0.37	0.44	0.31	0.45	0.34	0.47	0.41	0.38	0.4	0.41	0.44	0.38
83	0.59	0.52	0.48	0.57	0.54	0.68	0.56	0.55	0.54	0.62	0.67	0.68	0.7	0.58	0.6	0.64	0.44	0.31	0.35	0.21	0.36	0.44	0.41	0.43	0.48	0.47	0.42	0.48	0.42
84	0.48	0.55	0.35	0.49	0.5	0.62	0.6	0.51	0.51	0.54	0.57	0.58	0.58	0.59	0.56	0.65	0.35	0.48	0.42	0.48	0.38	0.35	0.34	0.32	0.28	0.29	0.3	0.35	0.33
85	0.45	0.48	0.4	0.45	0.47	0.62	0.58	0.48	0.48	0.52	0.56	0.57	0.58	0.55	0.5	0.59	0.41	0.48	0.41	0.4	0.31	0.35	0.32	0.24	0.29	0.4	0.22	0.29	0.27
86	0.5	0.5	0.47	0.48	0.53	0.66	0.57	0.46	0.45	0.57	0.6	0.61	0.62	0.53	0.55	0.58	0.46	0.41	0.45	0.35	0.35	0.42	0.38	0.34	0.38	0.46	0.31	0.37	0.31
87	0.46	0.5	0.39	0.48	0.48	0.61	0.62	0.5	0.52	0.5	0.57	0.57	0.57	0.58	0.52	0.63	0.45	0.5	0.45	0.44	0.38	0.35	0.36	0.27	0.21	0.34	0.27	0.31	0.3
88	0.47	0.4	0.29	0.49	0.39	0.56	0.61	0.5	0.51	0.54	0.58	0.58	0.59	0.57	0.52	0.62	0.39	0.45	0.38	0.38	0.39	0.28	0.37	0.32	0.37	0.32	0.31	0.35	0.35
90	0.48	0.48	0.37	0.52	0.43	0.57	0.64	0.55	0.57	0.53	0.6	0.61	0.61	0.59	0.54	0.64	0.43	0.48	0.41	0.42	0.43	0.3	0.42	0.35	0.3	0.32	0.35	0.4	0.38

	33	34	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	46	47	49	50	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
91	0.48	0.45	0.34	0.48	0.42	0.58	0.62	0.52	0.54	0.55	0.59	0.6	0.61	0.59	0.54	0.63	0.38	0.45	0.37	0.37	0.39	0.26	0.38	0.29	0.31	0.32	0.31	0.35	0.32
92	0.5	0.45	0.3	0.46	0.42	0.59	0.61	0.5	0.52	0.58	0.58	0.59	0.61	0.57	0.57	0.62	0.32	0.42	0.3	0.39	0.39	0.3	0.37	0.33	0.38	0.32	0.31	0.31	0.33
93	0.49	0.53	0.42	0.48	0.53	0.66	0.58	0.46	0.45	0.57	0.61	0.62	0.62	0.55	0.56	0.64	0.41	0.44	0.43	0.36	0.3	0.37	0.36	0.23	0.19	0.39	0.19	0.33	0.21
94	0.47	0.44	0.34	0.49	0.41	0.58	0.63	0.53	0.56	0.54	0.59	0.6	0.61	0.56	0.53	0.62	0.4	0.47	0.4	0.39	0.42	0.27	0.41	0.32	0.33	0.33	0.34	0.34	0.35
95	0.61	0.54	0.47	0.57	0.57	0.68	0.58	0.53	0.52	0.65	0.68	0.69	0.7	0.59	0.62	0.66	0.42	0.35	0.4	0.26	0.37	0.46	0.45	0.44	0.48	0.49	0.45	0.5	0.42
96	0.45	0.49	0.42	0.46	0.49	0.65	0.61	0.47	0.5	0.53	0.6	0.61	0.61	0.53	0.53	0.61	0.47	0.46	0.46	0.37	0.36	0.34	0.35	0.27	0.23	0.39	0.24	0.28	0.26
97	0.5	0.57	0.47	0.49	0.53	0.65	0.55	0.53	0.52	0.54	0.6	0.6	0.61	0.53	0.54	0.58	0.49	0.31	0.39	0.34	0.36	0.45	0.32	0.44	0.46	0.49	0.41	0.42	0.42
98	0.57	0.52	0.37	0.56	0.48	0.63	0.63	0.54	0.53	0.63	0.64	0.65	0.66	0.64	0.61	0.7	0.29	0.51	0.45	0.46	0.42	0.38	0.46	0.38	0.39	0.36	0.38	0.46	0.38
99	0.24	0.48	0.49	0.34	0.4	0.48	0.54	0.46	0.47	0.37	0.44	0.45	0.47	0.39	0.39	0.46	0.52	0.57	0.5	0.57	0.46	0.45	0.44	0.45	0.45	0.51	0.43	0.43	0.42
100	0.63	0.62	0.48	0.62	0.55	0.67	0.69	0.65	0.66	0.65	0.7	0.7	0.7	0.69	0.66	0.77	0.47	0.5	0.47	0.51	0.49	0.46	0.47	0.5	0.48	0.46	0.53	0.53	0.51
101	0.63	0.61	0.51	0.64	0.56	0.69	0.67	0.64	0.65	0.65	0.72	0.72	0.71	0.69	0.65	0.74	0.51	0.52	0.48	0.49	0.48	0.48	0.49	0.48	0.45	0.49	0.51	0.55	0.49
102	0.56	0.57	0.5	0.54	0.55	0.7	0.6	0.51	0.5	0.64	0.64	0.65	0.66	0.62	0.6	0.67	0.41	0.56	0.5	0.51	0.39	0.47	0.46	0.36	0.41	0.49	0.36	0.44	0.35

	33	34	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	46	47	49	50	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
103	0.51	0.48	0.34	0.51	0.45	0.58	0.61	0.56	0.58	0.53	0.6	0.61	0.61	0.57	0.54	0.62	0.41	0.37	0.29	0.38	0.38	0.31	0.3	0.4	0.41	0.34	0.4	0.37	0.41
104	0.48	0.46	0.28	0.47	0.41	0.56	0.62	0.51	0.53	0.55	0.57	0.58	0.58	0.58	0.55	0.63	0.32	0.38	0.31	0.4	0.39	0.25	0.34	0.34	0.37	0.28	0.3	0.32	0.35
105	0.55	0.52	0.33	0.53	0.49	0.61	0.67	0.54	0.56	0.61	0.62	0.63	0.64	0.63	0.61	0.68	0.29	0.46	0.41	0.44	0.45	0.31	0.42	0.39	0.37	0.31	0.39	0.4	0.39
106	0.54	0.6	0.44	0.52	0.52	0.65	0.65	0.56	0.55	0.59	0.61	0.62	0.61	0.63	0.61	0.69	0.41	0.52	0.48	0.53	0.42	0.42	0.42	0.37	0.35	0.42	0.38	0.4	0.37
107	0.63	0.57	0.5	0.59	0.55	0.69	0.6	0.58	0.57	0.67	0.7	0.71	0.71	0.66	0.64	0.71	0.42	0.49	0.43	0.44	0.41	0.48	0.47	0.46	0.5	0.51	0.47	0.52	0.46
108	0.47	0.51	0.44	0.48	0.47	0.63	0.58	0.48	0.49	0.55	0.57	0.58	0.59	0.56	0.53	0.62	0.45	0.52	0.45	0.48	0.35	0.41	0.37	0.34	0.36	0.44	0.29	0.37	0.32
109	0.55	0.57	0.54	0.54	0.61	0.64	0.44	0.4	0.38	0.64	0.58	0.6	0.6	0.55	0.61	0.59	0.49	0.6	0.57	0.57	0.49	0.56	0.55	0.5	0.52	0.56	0.47	0.53	0.45
110	0.55	0.57	0.57	0.54	0.61	0.63	0.41	0.41	0.38	0.64	0.58	0.59	0.6	0.52	0.61	0.57	0.54	0.59	0.57	0.56	0.5	0.57	0.55	0.5	0.53	0.59	0.48	0.54	0.46
111	0.4	0.48	0.41	0.45	0.45	0.59	0.59	0.49	0.51	0.47	0.52	0.54	0.55	0.52	0.49	0.57	0.48	0.51	0.45	0.46	0.37	0.35	0.36	0.31	0.31	0.39	0.3	0.33	0.32
112	0.58	0.62	0.5	0.58	0.58	0.69	0.62	0.57	0.58	0.59	0.66	0.66	0.66	0.64	0.6	0.69	0.5	0.51	0.47	0.49	0.37	0.49	0.4	0.42	0.39	0.48	0.42	0.47	0.42
113	0.56	0.53	0.42	0.58	0.47	0.62	0.67	0.58	0.58	0.61	0.65	0.65	0.65	0.67	0.62	0.71	0.44	0.49	0.45	0.46	0.45	0.39	0.46	0.4	0.39	0.39	0.4	0.46	0.42
114	0.66	0.62	0.52	0.66	0.58	0.72	0.7	0.65	0.66	0.68	0.73	0.75	0.74	0.71	0.67	0.77	0.51	0.54	0.5	0.49	0.49	0.48	0.51	0.49	0.48	0.49	0.52	0.56	0.52
115	0.57	0.51	0.4	0.54	0.52	0.63	0.61	0.49	0.48	0.64	0.64	0.65	0.66	0.63	0.61	0.65	0.31	0.51	0.43	0.45	0.4	0.38	0.46	0.39	0.41	0.39	0.38	0.44	0.36
116	0.61	0.63	0.53	0.55	0.58	0.72	0.55	0.56	0.55	0.66	0.67	0.68	0.69	0.61	0.63	0.67	0.44	0.51	0.45	0.5	0.38	0.51	0.41	0.44	0.49	0.53	0.45	0.47	0.43
117	0.52	0.49	0.35	0.54	0.46	0.57	0.62	0.58	0.58	0.54	0.58	0.58	0.59	0.58	0.58	0.62	0.43	0.33	0.25	0.38	0.39	0.35	0.33	0.43	0.46	0.37	0.41	0.38	0.45
118	0.53	0.55	0.48	0.52	0.42	0.58	0.68	0.59	0.6	0.58	0.61	0.61	0.6	0.63	0.6	0.68	0.52	0.57	0.53	0.59	0.57	0.47	0.54	0.51	0.49	0.48	0.53	0.53	0.52
119	0.53	0.59	0.47	0.53	0.53	0.65	0.62	0.55	0.55	0.58	0.61	0.62	0.61	0.62	0.59	0.68	0.47	0.55	0.5	0.53	0.42	0.47	0.44	0.36	0.34	0.45	0.37	0.43	0.36
120	0.53	0.51	0.39	0.55	0.48	0.6	0.66	0.57	0.57	0.56	0.62	0.63	0.63	0.65	0.59	0.69	0.42	0.48	0.43	0.44	0.44	0.36	0.44	0.35	0.34	0.35	0.37	0.42	0.39
121	0.58	0.6	0.53	0.55	0.61	0.71	0.53	0.52	0.5	0.62	0.66	0.66	0.68	0.58	0.59	0.65	0.47	0.4	0.45	0.31	0.33	0.48	0.39	0.42	0.44	0.52	0.4	0.47	0.38
122	0.5	0.49	0.48	0.49	0.5	0.64	0.61	0.5	0.53	0.56	0.59	0.6	0.62	0.52	0.54	0.58	0.51	0.47	0.5	0.39	0.43	0.46	0.44	0.39	0.43	0.48	0.38	0.36	0.37
210	0.47	0.41	0.32	0.48	0.37	0.55	0.64	0.53	0.56	0.54	0.56	0.57	0.57	0.55	0.53	0.6	0.39	0.45	0.36	0.42	0.44	0.25	0.38	0.39	0.39	0.29	0.37	0.28	0.38
211	0.43	0.4	0.37	0.46	0.4	0.51	0.55	0.41	0.44	0.51	0.53	0.54	0.54	0.52	0.49	0.59	0.41	0.51	0.45	0.48	0.46	0.39	0.47	0.41	0.4	0.4	0.4	0.46	0.39
280	0.51	0.46	0.36	0.5	0.45	0.61	0.64	0.51	0.53	0.58	0.61	0.62	0.63	0.61	0.56	0.64	0.36	0.46	0.39	0.4	0.39	0.3	0.4	0.29	0.35	0.36	0.32	0.37	0.33

	33	34	35	36	37	38	39	41	42	43	44	45	46	47	49	50	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
281	0.49	0.44	0.42	0.5	0.36	0.55	0.64	0.5	0.52	0.51	0.58	0.58	0.58	0.6	0.54	0.65	0.49	0.53	0.5	0.51	0.5	0.42	0.5	0.43	0.42	0.43	0.45	0.49	0.46
400	0.48	0.44	0.32	0.48	0.41	0.58	0.65	0.52	0.54	0.56	0.58	0.59	0.6	0.59	0.55	0.64	0.35	0.43	0.35	0.42	0.41	0.22	0.36	0.36	0.38	0.33	0.34	0.31	0.37
401	0.4	0.42	0.46	0.39	0.44	0.59	0.5	0.34	0.39	0.5	0.52	0.54	0.55	0.45	0.46	0.52	0.5	0.54	0.48	0.49	0.43	0.46	0.45	0.37	0.4	0.49	0.36	0.39	0.35
481	0.46	0.53	0.5	0.47	0.53	0.57	0.53	0.37	0.39	0.56	0.49	0.51	0.52	0.48	0.58	0.51	0.52	0.58	0.52	0.61	0.53	0.54	0.52	0.52	0.54	0.52	0.5	0.49	0.49
482	0.47	0.4	0.47	0.36	0.51	0.49	0.45	0.47	0.48	0.47	0.41	0.42	0.44	0.49	0.48	0.47	0.51	0.6	0.54	0.6	0.51	0.52	0.5	0.51	0.52	0.5	0.48	0.45	0.48
510	0.42	0.34	0.52	0.32	0.48	0.49	0.44	0.4	0.44	0.39	0.4	0.42	0.43	0.47	0.39	0.47	0.55	0.55	0.47	0.55	0.44	0.5	0.44	0.48	0.47	0.53	0.45	0.45	0.43
511	0.4	0.37	0.45	0.43	0.42	0.57	0.56	0.43	0.45	0.46	0.5	0.51	0.52	0.47	0.45	0.5	0.52	0.56	0.51	0.52	0.43	0.44	0.43	0.42	0.43	0.48	0.39	0.36	0.4
890	0.5	0.46	0.35	0.52	0.42	0.57	0.65	0.55	0.58	0.55	0.6	0.6	0.61	0.6	0.55	0.65	0.43	0.48	0.42	0.42	0.45	0.31	0.43	0.35	0.33	0.31	0.36	0.37	0.39
891	0.51	0.48	0.34	0.53	0.45	0.59	0.63	0.53	0.53	0.57	0.61	0.62	0.62	0.62	0.57	0.67	0.36	0.43	0.38	0.4	0.39	0.31	0.4	0.31	0.33	0.32	0.31	0.39	0.36

	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95
66	0																												
67	0.26	0																											
68	0.37	0.41	0																										
69	0.46	0.45	0.4	0																									
70	0.44	0.47	0.39	0.39	0																								
71	0.29	0.31	0.34	0.42	0.42	0																							
72	0.46	0.49	0.43	0.26	0.38	0.44	0																						
73	0.36	0.42	0.27	0.4	0.33	0.34	0.4	0																					
74	0.31	0.33	0.37	0.45	0.43	0.38	0.44	0.33	0																				
75	0.43	0.45	0.41	0.37	0.49	0.37	0.33	0.39	0.41	0																			
76	0.47	0.5	0.41	0.3	0.36	0.44	0.26	0.39	0.5	0.36	0																		
77	0.38	0.4	0.48	0.36	0.42	0.46	0.35	0.45	0.41	0.41	0.36	0																	
78	0.31	0.36	0.28	0.4	0.39	0.28	0.42	0.27	0.34	0.36	0.43	0.44	0																
79	0.43	0.47	0.49	0.58	0.55	0.49	0.55	0.49	0.46	0.53	0.54	0.53	0.47	0															
80	0.45	0.46	0.52	0.6	0.52	0.51	0.57	0.51	0.47	0.54	0.55	0.54	0.48	0.3	0														
81	0.42	0.45	0.36	0.3	0.42	0.4	0.34	0.33	0.38	0.28	0.37	0.4	0.32	0.54	0.53	0													
82	0.36	0.37	0.44	0.4	0.49	0.41	0.41	0.42	0.33	0.34	0.41	0.34	0.41	0.5	0.48	0.34	0												
83	0.4	0.43	0.45	0.31	0.41	0.46	0.32	0.43	0.38	0.39	0.38	0.23	0.42	0.53	0.53	0.34	0.34	0											
84	0.35	0.35	0.36	0.43	0.44	0.26	0.43	0.38	0.42	0.37	0.43	0.49	0.29	0.5	0.49	0.41	0.45	0.49	0										
85	0.31	0.35	0.33	0.43	0.39	0.28	0.42	0.3	0.34	0.37	0.44	0.42	0.23	0.46	0.48	0.35	0.4	0.43	0.33	0									
86	0.4	0.42	0.36	0.32	0.4	0.38	0.32	0.32	0.37	0.3	0.37	0.37	0.33	0.52	0.52	0.21	0.33	0.33	0.41	0.32	0								
87	0.32	0.34	0.37	0.47	0.43	0.25	0.47	0.37	0.39	0.4	0.47	0.46	0.29	0.5	0.48	0.42	0.39	0.48	0.31	0.27	0.38	0							
88	0.27	0.28	0.39	0.49	0.43	0.36	0.49	0.38	0.34	0.46	0.48	0.4	0.33	0.42	0.39	0.43	0.37	0.41	0.39	0.32	0.39	0.33	0						
90	0.29	0.31	0.44	0.51	0.49	0.34	0.5	0.44	0.33	0.44	0.53	0.44	0.37	0.48	0.45	0.46	0.35	0.44	0.38	0.36	0.44	0.29	0.3	0					
91	0.22	0.26	0.39	0.48	0.46	0.32	0.47	0.37	0.26	0.42	0.48	0.4	0.32	0.43	0.42	0.42	0.32	0.4	0.39	0.29	0.39	0.3	0.25	0.24	0				
92	0.3	0.31	0.36	0.45	0.43	0.38	0.4	0.38	0.31	0.41	0.44	0.4	0.36	0.41	0.42	0.41	0.38	0.39	0.36	0.35	0.39	0.38	0.31	0.34	0.29	0			

	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95	
93	0.29	0.35	0.29	0.34	0.38	0.19	0.33	0.23	0.3	0.25	0.38	0.38	0.19	0.51	0.53	0.23	0.31	0.36	0.27	0.21	0.2	0.22	0.35	0.33	0.31	0.36	0			
94	0.27	0.29	0.42	0.49	0.45	0.36	0.48	0.41	0.29	0.44	0.5	0.41	0.36	0.45	0.41	0.43	0.32	0.42	0.42	0.31	0.41	0.32	0.28	0.27	0.19	0.31	0.35	0		
95	0.4	0.45	0.42	0.31	0.4	0.47	0.33	0.39	0.4	0.42	0.31	0.28	0.44	0.52	0.55	0.38	0.35	0.25	0.5	0.46	0.37	0.5	0.43	0.48	0.43	0.42	0.4	0.45	0	
96	0.35	0.36	0.36	0.41	0.4	0.28	0.4	0.32	0.32	0.31	0.42	0.39	0.28	0.53	0.5	0.3	0.31	0.42	0.35	0.22	0.23	0.17	0.33	0.31	0.29	0.36	0.25	0.3	0.45	
97	0.47	0.5	0.45	0.33	0.38	0.45	0.27	0.42	0.48	0.33	0.25	0.35	0.41	0.54	0.53	0.33	0.41	0.34	0.44	0.4	0.33	0.46	0.46	0.51	0.47	0.44	0.36	0.49	0.37	
98	0.33	0.31	0.35	0.47	0.47	0.36	0.52	0.41	0.38	0.47	0.49	0.46	0.37	0.5	0.5	0.45	0.43	0.45	0.38	0.41	0.46	0.43	0.36	0.38	0.36	0.38	0.39	0.38	0.43	
99	0.51	0.52	0.46	0.54	0.5	0.48	0.51	0.45	0.48	0.48	0.52	0.58	0.43	0.47	0.43	0.46	0.52	0.56	0.46	0.43	0.47	0.47	0.47	0.48	0.48	0.46	0.46	0.48	0.57	
100	0.46	0.49	0.5	0.54	0.55	0.48	0.53	0.54	0.5	0.54	0.52	0.51	0.51	0.55	0.57	0.58	0.52	0.51	0.48	0.54	0.58	0.5	0.5	0.46	0.48	0.49	0.53	0.49	0.49	
101	0.44	0.48	0.49	0.53	0.54	0.47	0.55	0.53	0.48	0.56	0.55	0.5	0.49	0.57	0.58	0.57	0.5	0.48	0.51	0.52	0.56	0.48	0.48	0.44	0.45	0.51	0.5	0.46	0.48	
102	0.42	0.45	0.32	0.46	0.42	0.39	0.48	0.35	0.44	0.45	0.47	0.5	0.35	0.55	0.57	0.42	0.5	0.49	0.41	0.39	0.43	0.44	0.46	0.49	0.45	0.45	0.36	0.46	0.48	
103	0.36	0.39	0.47	0.46	0.41	0.42	0.43	0.46	0.4	0.48	0.43	0.4	0.42	0.46	0.43	0.48	0.42	0.39	0.42	0.41	0.46	0.39	0.34	0.36	0.33	0.33	0.44	0.34	0.42	
104	0.27	0.32	0.39	0.48	0.43	0.37	0.44	0.39	0.36	0.42	0.45	0.43	0.33	0.41	0.38	0.42	0.38	0.41	0.33	0.34	0.41	0.35	0.27	0.32	0.28	0.23	0.35	0.31	0.44	
105	0.31	0.31	0.43	0.49	0.48	0.35	0.47	0.42	0.38	0.44	0.44	0.46	0.4	0.46	0.46	0.47	0.4	0.47	0.35	0.4	0.46	0.4	0.37	0.36	0.33	0.33	0.39	0.36	0.44	
106	0.4	0.46	0.35	0.51	0.49	0.35	0.48	0.39	0.47	0.42	0.46	0.55	0.35	0.52	0.54	0.46	0.5	0.53	0.33	0.4	0.47	0.37	0.45	0.43	0.43	0.44	0.35	0.47	0.51	
107	0.42	0.48	0.41	0.47	0.43	0.49	0.49	0.43	0.45	0.53	0.46	0.43	0.45	0.54	0.58	0.51	0.5	0.41	0.52	0.48	0.52	0.52	0.46	0.5	0.45	0.46	0.49	0.47	0.38	
108	0.39	0.43	0.3	0.46	0.4	0.36	0.47	0.32	0.42	0.44	0.46	0.48	0.29	0.5	0.49	0.38	0.46	0.47	0.38	0.32	0.37	0.37	0.36	0.42	0.38	0.41	0.31	0.41	0.49	
109	0.53	0.53	0.46	0.49	0.47	0.51	0.53	0.42	0.51	0.53	0.53	0.58	0.47	0.59	0.58	0.46	0.56	0.55	0.49	0.5	0.48	0.54	0.53	0.58	0.55	0.53	0.47	0.57	0.54	
110	0.54	0.56	0.47	0.51	0.49	0.52	0.52	0.43	0.5	0.51	0.54	0.57	0.47	0.6	0.58	0.44	0.54	0.53	0.52	0.5	0.47	0.55	0.53	0.58	0.55	0.53	0.45	0.57	0.54	
111	0.36	0.38	0.4	0.47	0.42	0.32	0.47	0.38	0.37	0.41	0.49	0.48	0.31	0.51	0.46	0.39	0.41	0.48	0.36	0.27	0.37	0.27	0.35	0.33	0.32	0.39	0.29	0.32	0.52	
112	0.44	0.48	0.4	0.46	0.42	0.39	0.47	0.45	0.51	0.51	0.44	0.5	0.41	0.58	0.59	0.5	0.52	0.5	0.42	0.44	0.5	0.4	0.48	0.46	0.47	0.49	0.39	0.29	0.5	0.47
113	0.35	0.39	0.42	0.54	0.52	0.39	0.55	0.45	0.41	0.49	0.55	0.47	0.38	0.52	0.51	0.48	0.45	0.46	0.42	0.4	0.47	0.38	0.36	0.33	0.36	0.41	0.37	0.39	0.5	
114	0.44	0.48	0.51	0.56	0.53	0.48	0.56	0.54	0.5	0.58	0.55	0.49	0.52	0.59	0.6	0.59	0.52	0.5	0.52	0.52	0.58	0.49	0.5	0.45	0.46	0.52	0.51	0.47	0.48	
115	0.34	0.35	0.38	0.47	0.45	0.39	0.5	0.39	0.37	0.48	0.48	0.46	0.37	0.49	0.5	0.44	0.43	0.44	0.41	0.41	0.44	0.44	0.37	0.4	0.37	0.36	0.4	0.38	0.42	
116	0.48	0.53	0.4	0.44	0.41	0.48	0.41	0.4	0.49	0.48	0.41	0.5	0.44	0.56	0.6	0.49	0.56	0.47	0.46	0.47	0.49	0.51	0.53	0.56	0.51	0.48	0.45	0.53	0.45	
117	0.38	0.4	0.49	0.48	0.39	0.45	0.44	0.48	0.44	0.5	0.44	0.39	0.43	0.48	0.44	0.5	0.46	0.41	0.44	0.43	0.48	0.44	0.36	0.42	0.39	0.35	0.47	0.39	0.43	
118	0.47	0.51	0.52	0.63	0.62	0.5	0.61	0.55	0.5	0.54	0.6	0.6	0.52	0.46	0.48	0.58	0.54	0.58	0.51	0.53	0.58	0.5	0.48	0.46	0.46	0.49	0.49	0.49	0.58	
119	0.4	0.45	0.35	0.49	0.5	0.34	0.51	0.4	0.45	0.44	0.51	0.55	0.33	0.56	0.56	0.43	0.48	0.52	0.38	0.37	0.45	0.35	0.44	0.41	0.42	0.46	0.3	0.45	0.52	
120	0.28	0.33	0.43	0.52	0.51	0.34	0.53	0.43	0.36	0.46	0.54	0.45	0.37	0.48	0.5	0.47	0.4	0.45	0.39	0.36	0.45	0.32	0.33	0.29	0.29	0.36	0.3	0.34	0.47	
121	0.44	0.48	0.4	0.28	0.4	0.43	0.32	0.38	0.45	0.34	0.3	0.33	0.38	0.59	0.59	0.32	0.4	0.31	0.44	0.41	0.34	0.46	0.48	0.5	0.46	0.48	0.32	0.48	0.32	
122	0.46	0.44	0.43	0.38	0.44	0.44	0.37	0.41	0.43	0.36	0.42	0.41	0.4	0.56	0.54	0.31	0.36	0.4	0.47	0.38	0.27	0.4	0.43	0.44	0.42	0.42	0.34	0.4	0.44	
210	0.35	0.33	0.45	0.52	0.46	0.42	0.48	0.45	0.35	0.45	0.5	0.44	0.4	0.45	0.38	0.45	0.38	0.45	0.4	0.37	0.43	0.37	0.31	0.33	0.29	0.28	0.41	0.26	0.49	
211	0.36	0.36	0.43	0.51	0.48	0.42	0.54	0.44	0.4	0.51	0.52	0.5	0.41	0.42	0.36	0.46	0.42	0.48	0.43	0.44	0.47	0.44	0.34	0.39	0.36	0.4	0.43	0.39	0.47	
280	0.25	0.31	0.37	0.48	0.45	0.35	0.48	0.37	0.31	0.45	0.48	0.39	0.33	0.4	0.44	0.44	0.37	0.41	0.4	0.32	0.41	0.36	0.3	0.33	0.24	0.3	0.35	0.29	0.4	
281	0.39	0.43	0.44	0.59	0.55	0.43	0.58	0.47	0.44	0.53	0.57	0.52	0.45	0.42	0.41	0.54	0.47	0.52	0.48	0.45	0.51	0.4	0.38	0.38	0.37	0.45	0.45	0.41	0.52	
400	0.33	0.33	0.42	0.51	0.45	0.41	0.47	0.4	0.35	0.46	0.47	0.42	0.36	0.43	0.4	0.45	0.38	0.45	0.38	0.36	0.43	0.36	0.29	0.34	0.3	0.26	0.4	0.31	0.45	
401	0.45	0.45	0.38	0.47	0.42	0.43	0.45	0.36	0.39	0.47	0.5	0.51	0.39	0.46	0.44	0.41	0.46	0.5	0.45	0.39	0.4	0.39	0.41	0.44	0.42	0.4	0.39	0.42	0.51	
481	0.56	0.55	0.5	0.54	0.49	0.53	0.53	0.49	0.53	0.55	0.54	0.62	0.52	0.53	0.51	0.52	0.58	0.6	0.5	0.52	0.52	0.54	0.53	0.59	0.56	0.5	0.53	0.56	0.59	

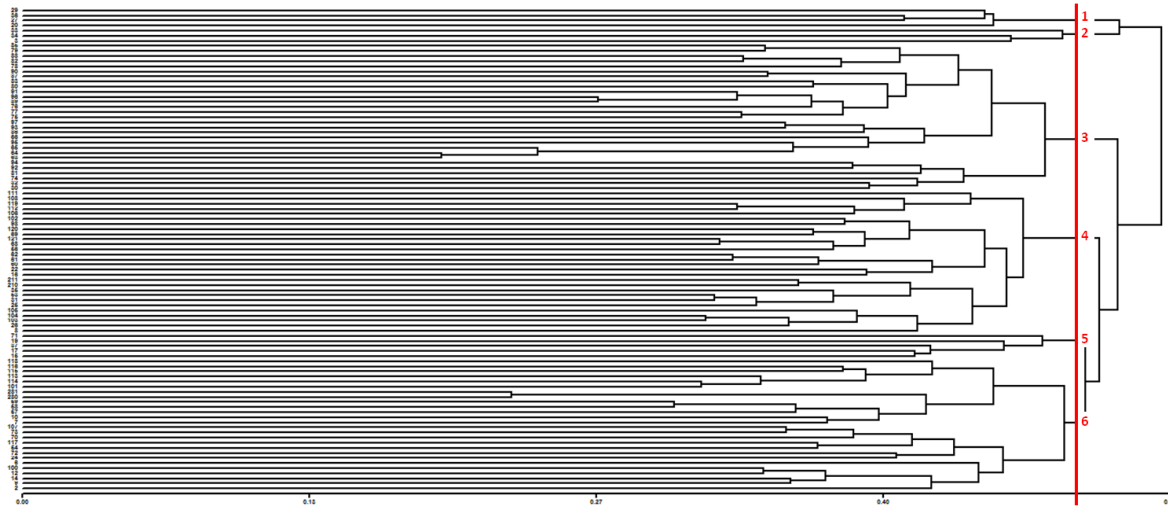
	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95
482	0.54	0.54	0.48	0.54	0.47	0.51	0.53	0.47	0.54	0.54	0.53	0.61	0.5	0.43	0.4	0.51	0.57	0.59	0.48	0.5	0.51	0.53	0.51	0.58	0.55	0.49	0.51	0.54	0.58
510	0.53	0.54	0.47	0.5	0.44	0.51	0.48	0.45	0.49	0.53	0.5	0.57	0.47	0.39	0.33	0.48	0.52	0.54	0.5	0.48	0.47	0.49	0.49	0.54	0.51	0.49	0.48	0.51	0.54
511	0.47	0.46	0.43	0.52	0.41	0.46	0.51	0.39	0.44	0.51	0.52	0.52	0.41	0.49	0.43	0.45	0.49	0.53	0.47	0.37	0.42	0.41	0.4	0.47	0.44	0.45	0.43	0.42	0.54
890	0.3	0.29	0.44	0.52	0.48	0.35	0.51	0.45	0.35	0.45	0.53	0.43	0.38	0.48	0.45	0.47	0.35	0.45	0.4	0.36	0.45	0.28	0.28	0.21	0.25	0.34	0.35	0.25	0.48
891	0.24	0.31	0.39	0.49	0.44	0.32	0.49	0.38	0.35	0.44	0.49	0.41	0.31	0.45	0.45	0.43	0.38	0.4	0.35	0.33	0.42	0.31	0.27	0.26	0.27	0.32	0.3	0.31	0.43

	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	210	211	
96	0																													
97	0.37	0																												
98	0.45	0.53	0																											
99	0.45	0.48	0.54	0																										
100	0.55	0.54	0.44	0.6	0																									
101	0.52	0.55	0.44	0.62	0.22	0																								
102	0.44	0.51	0.36	0.53	0.49	0.48	0																							
103	0.41	0.4	0.43	0.49	0.41	0.43	0.52	0																						
104	0.37	0.42	0.37	0.46	0.47	0.49	0.46	0.28	0																					
105	0.41	0.49	0.32	0.52	0.45	0.49	0.45	0.36	0.3	0																				
106	0.42	0.49	0.39	0.51	0.4	0.42	0.34	0.46	0.4	0.41	0																			
107	0.54	0.51	0.39	0.6	0.4	0.39	0.35	0.45	0.47	0.46	0.44	0																		
108	0.35	0.44	0.4	0.45	0.5	0.48	0.32	0.46	0.38	0.46	0.34	0.42	0																	
109	0.52	0.55	0.51	0.52	0.66	0.65	0.48	0.59	0.53	0.55	0.56	0.55	0.49	0																
110	0.5	0.53	0.55	0.52	0.67	0.66	0.51	0.6	0.54	0.58	0.57	0.57	0.5	0.24	0															
111	0.19	0.45	0.45	0.41	0.55	0.53	0.45	0.41	0.38	0.44	0.43	0.54	0.35	0.53	0.52	0														
112	0.44	0.47	0.43	0.57	0.39	0.36	0.4	0.44	0.47	0.47	0.32	0.41	0.38	0.59	0.6	0.46	0													
113	0.41	0.53	0.35	0.56	0.4	0.38	0.41	0.43	0.36	0.42	0.33	0.42	0.36	0.59	0.6	0.43	0.37	0												
114	0.52	0.57	0.44	0.65	0.29	0.25	0.49	0.45	0.5	0.47	0.44	0.4	0.51	0.66	0.68	0.53	0.38	0.4	0											
115	0.45	0.53	0.3	0.53	0.5	0.5	0.4	0.44	0.37	0.34	0.46	0.4	0.44	0.45	0.48	0.45	0.49	0.43	0.51	0										
116	0.52	0.46	0.46	0.56	0.47	0.49	0.37	0.47	0.49	0.48	0.42	0.37	0.46	0.51	0.53	0.53	0.43	0.53	0.51	0.46	0									
117	0.45	0.42	0.45	0.52	0.46	0.48	0.53	0.28	0.33	0.42	0.49	0.46	0.47	0.59	0.6	0.44	0.47	0.46	0.5	0.45	0.49	0								
118	0.5	0.58	0.49	0.51	0.44	0.46	0.54	0.5	0.47	0.48	0.42	0.52	0.49	0.65	0.65	0.52	0.49	0.38	0.47	0.55	0.58	0.55	0							
119	0.35	0.5	0.4	0.52	0.44	0.41	0.36	0.48	0.43	0.46	0.25	0.46	0.32	0.56	0.56	0.39	0.31	0.29	0.45	0.46	0.48	0.52	0.41	0						
120	0.33	0.52	0.4	0.53	0.48	0.46	0.49	0.4	0.34	0.37	0.42	0.49	0.45	0.59	0.59	0.38	0.46	0.34	0.47	0.41	0.55	0.44	0.47	0.4	0					
121	0.39	0.33	0.47	0.55	0.54	0.52	0.44	0.48	0.48	0.49	0.48	0.44	0.45	0.5	0.49	0.47	0.45	0.53	0.53	0.45	0.4	0.49	0.63	0.48	0.51	0				
122	0.28	0.4	0.52	0.49	0.62	0.6	0.48	0.49	0.45	0.5	0.52	0.57	0.45	0.55	0.53	0.39	0.54	0.52	0.61	0.5	0.55	0.5	0.61	0.5	0.5	0.41	0			
210	0.35	0.47	0.43	0.45	0.51	0.52	0.5	0.33	0.28	0.36	0.47	0.52	0.43	0.57	0.57	0.35	0.53	0.44	0.53	0.42	0.54	0.35	0.51	0.49	0.39	0.51	0.41	0		
211	0.46	0.52	0.38	0.41	0.53	0.51	0.49	0.42	0.37	0.41	0.5	0.5	0.43	0.47	0.49	0.43	0.52	0.45	0.54	0.4	0.56	0.45	0.45	0.48	0.43	0.52	0.52	0.4	0	

	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	210	211
280	0.37	0.49	0.35	0.49	0.45	0.44	0.43	0.37	0.31	0.35	0.44	0.42	0.41	0.54	0.56	0.39	0.47	0.37	0.44	0.35	0.48	0.4	0.47	0.45	0.33	0.48	0.45	0.35	0.38
281	0.44	0.56	0.41	0.5	0.47	0.45	0.51	0.45	0.42	0.45	0.44	0.49	0.45	0.59	0.6	0.46	0.47	0.34	0.48	0.48	0.56	0.5	0.34	0.42	0.39	0.57	0.55	0.47	0.37
400	0.35	0.46	0.39	0.45	0.47	0.5	0.47	0.31	0.23	0.32	0.43	0.48	0.41	0.56	0.57	0.38	0.5	0.4	0.5	0.38	0.5	0.34	0.49	0.48	0.38	0.51	0.45	0.26	0.4
401	0.35	0.48	0.51	0.38	0.61	0.59	0.48	0.47	0.43	0.5	0.5	0.55	0.43	0.45	0.45	0.39	0.52	0.52	0.6	0.49	0.52	0.51	0.52	0.49	0.49	0.5	0.42	0.44	0.36
481	0.55	0.55	0.56	0.45	0.66	0.68	0.56	0.56	0.52	0.56	0.57	0.63	0.52	0.42	0.45	0.52	0.61	0.63	0.7	0.52	0.57	0.53	0.6	0.59	0.61	0.59	0.55	0.52	0.47
482	0.54	0.54	0.55	0.44	0.65	0.67	0.54	0.54	0.5	0.54	0.55	0.61	0.5	0.46	0.49	0.51	0.6	0.61	0.69	0.54	0.57	0.54	0.59	0.57	0.6	0.57	0.53	0.5	0.45
510	0.47	0.49	0.56	0.38	0.62	0.62	0.54	0.49	0.49	0.55	0.56	0.58	0.48	0.5	0.51	0.46	0.56	0.6	0.65	0.55	0.55	0.5	0.58	0.56	0.56	0.52	0.51	0.49	0.42
511	0.35	0.49	0.52	0.4	0.61	0.6	0.49	0.49	0.45	0.51	0.52	0.56	0.42	0.49	0.49	0.38	0.54	0.52	0.61	0.5	0.55	0.49	0.55	0.51	0.51	0.53	0.4	0.4	0.42
890	0.32	0.51	0.39	0.51	0.49	0.47	0.5	0.36	0.32	0.37	0.45	0.5	0.44	0.59	0.59	0.34	0.48	0.36	0.47	0.42	0.56	0.4	0.48	0.44	0.3	0.52	0.41	0.3	0.41
891	0.36	0.48	0.33	0.51	0.46	0.44	0.43	0.35	0.26	0.34	0.38	0.44	0.38	0.54	0.55	0.37	0.43	0.29	0.45	0.36	0.5	0.39	0.46	0.39	0.27	0.47	0.47	0.37	0.38

	280	281	400	401	481	482	510	511	890	891
281	0.38	0								
400	0.3	0.43	0							
401	0.44	0.44	0.43	0						
481	0.56	0.58	0.54	0.43	0					
482	0.55	0.57	0.53	0.44	0.37	0				
510	0.53	0.51	0.5	0.36	0.42	0.3	0			
511	0.44	0.47	0.42	0.34	0.47	0.43	0.39	0		
890	0.33	0.4	0.32	0.45	0.58	0.57	0.55	0.45	0	
891	0.28	0.36	0.31	0.45	0.58	0.56	0.54	0.47	0.26	0

a)



b)

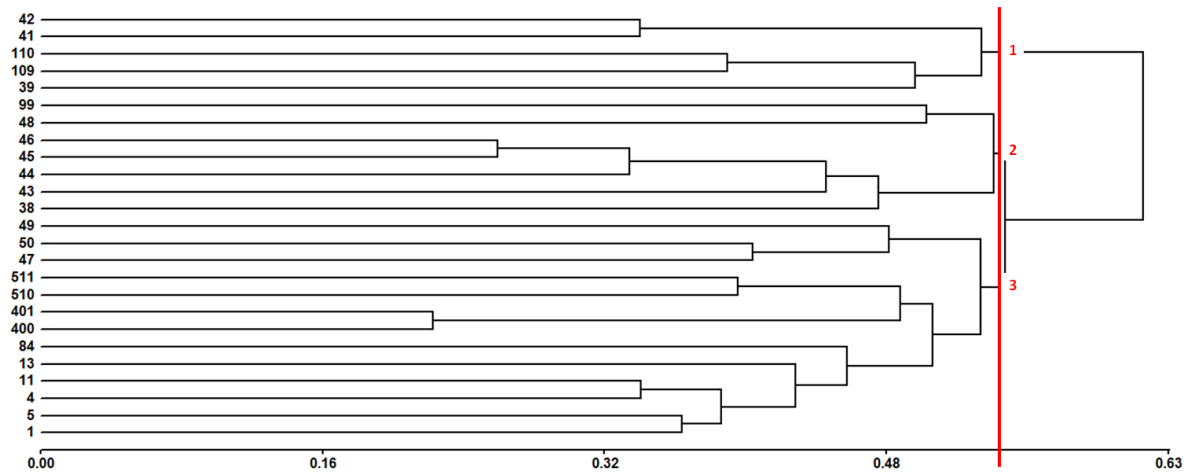


Figura 1: Dendrogramas obtenidos a partir del criterio de estratificación E2 mostrando los 6 grupos **(a)** y los 3 grupos **(b)** considerados para la construcción de la CC.

Tabla 7: Valores medios (\bar{X}) y varianzas (σ^2) para cada variable cuantitativa en la colección activa (CA) y en cada colección núcleo según el criterio de **estratificación E1**. Cada valor es expresado como $\bar{X} + \sigma^2$.

Grupo		AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV
1	CA	116,6+385,1	89,8+0,6	96,7+ 0,4	158,8+ 60,1	11,3+ 0,1	11,6+0,1	6,04+0,01	1,14+0,01
	E1F	116,6+385,1	89,8+0,6	96,7+ 0,4	158,8+ 60,1	11,3+0,1	11,6+0,1	6,04+0,01	1,14+0,01
	E1L	136,3+176,9	90,5+14,4	96,1+8,4	151,0+0,2	11,5+4,0	11,5+4,0	6,05+0,01	1,17+0,01
	E1P	136,3+176,9	90,5+14,4	96,1+8,4	151,0+2	11,5+4,0	11,5+4,0	6,05+0,01	1,17+0,01
2	CA	39,3+33,7	104,8+0,1	108,1+ 0,2	135,8+26,7	14,2+ 3,5	14,4+2,7	2,70+0,10	0,67+0,01
	E1F	43,0+9,0	104,8+0,1	107,8+0,1	133,0+16,0	15,3+1,7	15,3+1,7	2,73+0,14	0,64+0,01
	E1L	43,0+9,0	104,8+0,1	107,8+0,1	133,0+16,0	15,3+1,7	15,3+1,7	2,73+0,14	0,64+0,01
	E1P	40,0+100,0	105,0+182,3	108,8+98,0	137,0+484	14,0+0,0	14,0+0,1	2,35+0,08	0,70+0,01
3	CA	122,7+199,6	111,7+315,5	118,1+333,1	174,2+ 60,3	16,4+ 6,0	16,5+5,9	4,44+2,07	0,84+0,07
	E1F	127,6+28,9	121,8+10,6	127,5+18,1	176,8+1,6	18,9+3,5	18,9+3,5	3,74+0,02	0,71+0,01
	E1L	117,0+244,3	106,7+462,1	112,3+472,1	170,8+71,1	17,1+8,8	17,1+8,8	4,92+2,84	0,93+0,10
	E1P	122,3+23,0	118,5+1,7	123,3+3,24	175,5+0,2	17,0+0,8	17,0+0,8	3,89+0,01	0,73+0,01
4	CA	155,6+147,7	135,2+345,4	141,4+ 350,7	174,6+121,1	24,6+46,8	24,6+46,8	5,64+0,35	0,98+0,01
	E1F	169,5+42,3	139,5+30,3	143,3+52,6	168,5+132,3	28,8+5,1	28,8+5,1	5,66+0,50	1,00+0,01
	E1L	161,8+145,7	125,0+440,7	128,8+455,5	168,8+88,4	23,4+60,3	23,4+60,3	5,87+0,45	1,00+0,01
	E1P	176,0+552,3	134,0+2,25	136,0+1,5	180,0+0,0	26,5+13,7	26,5+13,7	6,40+0,01	1,10+0,01
5	CA	122,9+944,6	105,9+258,4	111,1+302,3	156,4+243,9	21,4+33,1	21,4+33,1	5,37+0,08	0,92+0,01
	E1F	100,7+2,3	98,2+205,9	102,4+205,9	147,9+147,0	18,6+26,3	18,6+26,3	5,32+0,11	0,89+0,01
	E1L	100,7+2,3	98,2+205,9	102,4+205,9	147,9+147,0	18,6+26,3	18,6+26,3	5,32+0,11	0,89+0,01
	E1P	102,2+0,4	112,5+4,8	116,3+10,2	160,0+130,0	23,8+2,0	23,8+2,0	5,65+0,19	0,98+0,01

6	CA	105,1+1942,2	90,2+157,2	94,8+155,1	151,1+ 220,4	13,0+ 10,7	13,1+10,6	7,05+1,35	1,26+0,04
	E1F	131,30+865,2	89,0+1,0	94,6+1,2	146,0+42,3	16,0+3,4	16,0+3,4	7,16+1,63	1,43+0,03
	E1L	116,7+1512,2	88,2+118,8	92,9+100,1	146,5+169,1	14,5+2,5	14,5+2,4	6,81+1,66	1,23+0,04
	E1P	111,8+1466,2	90,3+147,2	94,5+131,4	147,5+175,4	14,1+5,9	14,2 +5,6	7,10+1,69	1,32+0,05
7	CA	99,8+1642,2	90,9+120,9	96,0+117,6	155,9+224,6	12,7+ 8,9	12,8+9,1	7,43+0,40	1,30+0,02
	E1F	64,3+0,1	83,8+10,6	88,8+18,1	140,0+16,0	12,9+15,8	12,6+18,1	8,29+1,24	1,39+0,06
	E1L	95,2+1604,3	93,9+47,8	99,0+50,2	153,5+157,9	13,8+9,4	13,8+10,3	7,84+0,52	1,31+0,03
	E1P	94,4+1278,1	88,9+91,8	94,5+97,6	155,0+322,9	12,5+9,0	12,5+9,2	7,46+0,60	1,32+0,03

Continuación tabla 7

Grupo		LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
1	CA	2,56+ 0,02	1,50+0,01	4,26+0,01	2,35+0,01	689+ 25841	3421+ 576461	5,40+ 0,01	225+ 5152
	E1F	2,56+ 0,02	1,50+0,01	4,26+0,01	2,35+0,01	689+ 25841	3421+ 576461	5,40+ 0,01	225+ 5152
	E1L	2,70+0,06	1,60+0,01	4,30+0,02	2,34+0,01	850+81225	4180+1934881	5,50+0,03	296+1600
	E1P	2,70+0,06	1,60+0,01	4,30+0,02	2,34+0,01	850+81225	4180+1934881	5,50+0,03	296+1600
2	CA	2,43+0,03	1,38+0,13	3,63+0,03	1,90+0,14	156+ 19609	378+ 113238	3,77+ 0,01	21+155
	E1F	2,52+0,02	1,54+0,12	3,71+0,03	2,07+0,13	197+24492	487+134322	3,75+0,01	18+194
	E1L	2,52+0,02	1,54+0,12	3,71+0,03	2,07+0,13	197+24492	487+134322	3,75+0,01	18+194
	E1P	2,65+0,00	1,88+0,00	3,87+0,00	2,42+0,00	353+140625	853+693889	3,80+0,08	32+256
3	CA	5,45+ 0,09	2,48+0,13	8,14+0,52	3,88+0,20	2940+1337761	7750+6408114	4,53+ 1,97	249+11435
	E1F	5,24+0,04	2,29+0,10	8,68+0,03	3,91+0,10	3502+350050	8574+932673	4,00+0,10	174+820
	E1L	5,29+0,04	2,56+0,21	8,33+0,26	4,06+0,10	2607+1834402	6690+7725091	5,10+2,46	267+177470
	E1P	5,03+0,00	1,99+0,00	8,51+0,00	3,63+0,00	4093+16900	9540+85849	4,25+0,05	203+784
4	CA	3,06+0,77	1,72+0,28	5,14+0,86	2,86+0,50	1780+ 190837	5521+3475185	5,51+ 0,19	427+50674
	E1F	2,92+1,30	1,70+0,60	4,88+1,80	2,92+1,10	1805+3025	5510+48400	5,80+0,20	372+2162
	E1L	3,23+1,05	1,79+0,39	5,16+1,39	2,91+0,71	1891+16866	6310+1312267	5,78+0,11	517+43565
	E1P	4,05+0,67	2,45+0,20	6,23+1,12	3,95+0,18	1750+2500	5290+16900	6,20+0,27	418+100
5	CA	4,16+0,10	1,93+0,01	6,26+0,99	3,15+0,26	1427+13241	4770+1985893	5,18+ 0,44	324+ 8449
	E1F	4,03+0,10	1,90+0,01	5,64+0,30	2,88+0,20	1409+18948	4711+2968384	5,10+0,64	262+953
	E1L	4,03+0,10	1,90+0,01	5,64+0,30	2,88+0,20	1409+18948	4711+2968384	5,10+0,64	262+953
	E1P	4,35+0,77	1,97+0,14	6,22+0,76	3,28+0,50	1272+720801	2989+3771364	5,90+0,05	292+31329
6	CA	4,47+1,65	2,64+0,72	6,70+1,71	3,89+0,92	947+288824	3244+2758499	6,86+ 1,03	438+51252
	E1F	5,31+0,99	2,74+0,01	7,32+0,01	3,75+0,35	1091+77981	3683+424778	8,24+1,03	655+601

	E1L	4,19+1,44	1,85+0,02	5,98+1,33	3,26+0,53	985+109810	3621+380967	6,74+1,87	536+31051
	E1P	4,75+1,58	2,79+0,83	6,87+2,60	4,01+1,48	804+196964	2749+1536750	7,02+1,68	421+48694
7	CA	3,25+4,30	1,86+1,46	6,49+0,82	3,62+0,45	916+262321	3389+3966798	7,02+ 0,51	465+53447
	E1F	2,76+7,62	1,80+3,24	7,03+1,89	4,14+0,98	259+15625	755+70889	8,11+1,04	182+2849
	E1L	3,30+4,57	1,92+1,63	6,72+0,61	3,78+0,35	794+247606	3033+3936403	7,25+0,94	397+45833
	E1P	3,82+2,83	2,16+0,98	6,52+1,18	3,58+0,65	807+146757	3048+2746781	7,09+0,75	405+36712

Tabla 8: Valores medios (\bar{X}) y varianzas (σ^2) para cada variable cuantitativa en la colección activa (CA) y en cada colección núcleo según el criterio de **estratificación E2**. Cada valor es expresado como $\bar{X} + \sigma^2$.

Cultivares									
Grupo		AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV
1	CA	133,0+1150,3	88,5+422,5	95,0+445,1	147,0+682,3	16,3+15,2	16,9+12,5	5,48+1,22	1,07+0,04
	E2F	113,9+606,4	88,5+676,0	93,0+576,0	144,5+676,0	14,6+4,5	14,8+4,0	6,24+0,91	1,16+0,05
	E2L	113,9+606,4	88,5+676,0	93,0+576,0	144,5+676,0	14,6+4,5	14,8+4,0	6,24+0,91	1,16+0,05
	E2P	138,5+324,0	114,5+4,41	117,0+6,25	170,5+0,4	16,8+0,5	16,8+0,5	7,19+2,10	1,38+0,06
2	CA	154,2+ 89,6	117,2+250,1	122,6+275,7	173,2+ 8,2	20,5+34,6	20,5+34,6	5,73+0,15	0,99+0,01
	E2F	158,0+90,3	127,8+39,1	134,0+22,6	175,0+2,3	24,4+6,9	24,4+6,9	5,45+0,01	0,98+0,01
	E2L	158,0+90,3	127,8+39,1	134,0+22,6	175,0+2,3	24,4+6,9	24,4+6,9	5,45+0,01	0,98+0,01
	E2P	167,5+441	121,5+1,4	129,3+3,2	173,5+0,5	27,0+2,0	27,0+2,0	5,48+0,06	0,98+0,01
3	CA	106,1+1308,4	93,9+32,9	99,4+ 34,2	157,8+ 114,7	14,1+ 5,4	14,2+ 5,4	7,27+0,21	1,26+0,01
	E2F	105,1+1674,0	91,0+16,0	100,1+49,0	151,0+225,1	15,9+0,9	15,9+0,9	7,18+0,01	1,22+0,01
	E2L	98,3+1814,6	91,8+38,9	98,1+52,8	150,3+134,1	13,7+3,6	13,8+3,1	7,18+0,19	1,23+0,01
	E2P	97,8 +1486,8	92,4+36,3	98,4+44,7	154,8+161,4	14,5+3,6	14,6+3,3	7,15+0,15	1,23+0,01
4	CA	90,9+1600,7	87,2+ 72,5	92,3+ 70,4	147,0+ 122,8	12,4+ 6,0	12,5+ 5,8	7,04+0,53	1,24+0,01
	E2F	95,9+35,5	83,8+39,1	89,1+43,9	137,3+5,1	16,4+2,0	16,4+2,0	6,73+0,72	1,22+0,01
	E2L	95,9+1372,7	91,2+44,4	95,8+39,1	151,0+129,5	13,7+5,6	13,7+5,6	6,90+0,46	1,22+0,01
	E2P	90,1+1412,2	90,4+36,8	95,2+31,1	150,8+119,7	13,3+5,1	13,3+5,1	7,11+0,50	1,23+0,01
5	CA	143,0+ 944,0	93,6+277,7	98,0+262,8	156,9+430,3	15,2+ 3,4	15,2+ 3,4	7,32+0,77	1,37+0,04
	E2F	112,7+283,9	87,3+115,6	93,3+126,6	162,3+10,6	13,8+0,1	13,8+0,1	7,58+0,08	1,40+0,01
	E2L	123,8+436,4	96,8+260,7	101,8+228,9	165,3+26,1	14,8+2,4	14,8+2,4	7,13+0,44	1,32+0,01

	E2P	129,5+151,3	98,0±2,4	104,5±28,1	165,5±13,7	14,0±4,1	14,0±4,1	7,85±0,17	1,43±0,01
6	CA	84,8+1237,2	88,5+116,8	93,2+113,6	154,2+174,5	11,2+ 7,5	11,2+ 7,6	7,79+0,90	1,39+0,04
	E2F	122,5+1466,1	87,8+0,1	93,4+0,1	148,3+18,1	14,1+0,1	14,1+0,1	8,99+0,31	1,68+0,01
	E2L	105,5+863,9	92,5+40,1	97,7+32,5	152,4+105,9	13,7+3,8	13,7+3,8	8,18+0,94	1,54+0,04
	E2P	84,8+1689,2	87,7+86,1	92,2+99,2	148,6+113,0	12,8+12,4	12,8+12,4	8,23+1,01	1,54+0,03
No Cultivares									
Grupo		AP	DF	DV	DC	PNF	NPV	LV	AV
1	CA	70,2+1610,0	98,8+ 54,9	103,5+ 31,2	145,0+166,6	13,0+ 4,2	13,3+ 3,6	4,03+2,74	0,86+0,06
	E2F	88,1+2316,0	97,8+52,6	102,0+35,5	144,0+49,0	12,8+1,6	12,8+1,6	4,20+3,42	0,94+0,06
	E2L	74,1+1938,4	100,0+45,2	103,9+30,3	139,0+82,7	14,0+4,3	14,0+4,3	3,83+2,55	0,82+0,06
	E2P	136,3+176,9	90,5+14,4	96,1+8,4	151,0+0,2	11,5+4,0	11,5+4,0	6,05+0,01	1,17+0,01
2	CA	126,3+ 425,5	115,9+206,8	121,3+224,2	169,9+239,1	18,3+13,6	18,4+13,4	4,41+ 0,67	0,80+0,02
	E2F	112,2+108,0	115,5+9,0	119,8 +12,0	167,8+60,1	20,4+11,4	20,4+11,4	4,77+0,77	0,86+0,02
	E2L	107,9+105,2	104,9+229,3	109,1+237,8	157,1+267,6	18,1+18,1	18,1+18,1	4,84+0,53	0,83+0,01
	E2P	112,2+108,0	115,5+9,0	119,8 +12,0	167,8+60,1	20,4+11,4	20,4+11,4	4,77+0,77	0,86+0,02
3	CA	136,8+1967,7	100,2+741,3	104,7+698,0	161,7+428,5	15,3+66,8	15,3+66,5	6,93+1,47	1,20+0,05
	E2F	122,5+2862,3	116,3+315,1	119,0+289,0	173,5+42,3	18,0+72,3	18,0+72,3	7,21+0,66	1,20+0,01
	E2L	138,8+1704,2	105,3+278,6	108,6+252,2	164,0+112,5	16,4+39,1	16,4+39,1	6,77+1,40	1,15+0,01
	E2P	138,75+1704,2	105,3+278,6	108,6+252,2	164,0+112,5	16,4+39,1	16,4+39,1	6,77+1,4	1,15+0,01

Continuación tabla 8

Cultivares									
Grupo		LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
1	CA	3,88+1,37	2,16+0,41	5,90+1,45	3,07+0,29	1343+191457	4156+2096450	4,98+0,19	275+24797
	E2F	2,84+0,35	1,61+0,15	5,02+0,66	2,79+0,22	1183+107748	3488+422825	5,00+0,02	211+772
	E2L	2,84+0,35	1,61+0,15	5,02+0,66	2,79+0,22	1183+107748	3488+422825	5,00+0,02	211+772
	E2P	3,43+0,01	1,99+0,01	5,83+0,10	3,25+0,01	1512+595984	4139+4255969	5,15+0,03	183+3481
2	CA	3,85+0,22	1,96+0,01	6,20+0,86	3,26+0,10	1501+197689	5014+5360336	5,47+0,04	457+79557
	E2F	3,86+0,33	1,96+0,01	6,44+1,13	3,44+0,07	1219+58806	3566+1749668	5,33+0,01	283+27712
	E2L	3,86+0,33	1,96+0,01	6,44+1,13	3,44+0,07	1219+58806	3566+1749668	5,33+0,01	283+27712
	E2P	4,43+0,96	1,99+0,08	7,5+4,97	3,69+0,58	1462+289444	4888,5+5750404	5,35+0,20	449+5476
3	CA	2,74+5,45	1,51+1,73	6,48+0,51	3,64+0,47	1020+197941	3655+3089207	6,89+0,20	520+42676
	E2F	1,69+2,86	0,85+0,72	5,11+0,29	2,64+0,26	526+20022	1654+400689	7,05+0,01	319+7119
	E2L	2,86+4,31	1,56+1,33	6,07+0,76	3,40+0,68	735+135360	2625+2383836	6,80+0,13	419+29499
	E2P	2,66+4,40	1,46+1,38	6,21+0,63	3,39+0,51	857+150484	3113+2687719	6,81+0,30	481+35244
4	CA	4,25+2,72	2,47+1,04	6,73+0,95	3,91+0,54	884+203779	3139+2589183	6,90+0,33	447+54403
	E2F	3,15+9,92	1,36+1,84	6,66+0,48	3,09+0,01	1025+119025	3193+1305306	7,01+0,04	461+28759
	E2L	3,25+5,89	1,72+1,49	6,41+0,31	3,48+0,14	994+41287	3738+887756	6,77+0,11	586+58324
	E2P	3,68+5,06	2,04+1,49	6,79+1,05	3,77+0,60	876+75273	3426+999922	6,88+0,19	448+58768
5	CA	5,06+0,28	2,80+0,14	7,59+0,30	4,15+0,13	1455+426230	5317+5645398	7,23+1,04	615+59025
	E2F	5,20+0,04	2,77+0,11	7,28+0,13	4,03+0,12	1016+39502	3529+370272	7,53+0,05	562+11910
	E2L	4,82+0,31	2,62+0,12	7,19+0,10	3,98+0,08	1233+120296	4633+2683008	7,38+0,07	602+11153
	E2P	4,99+0,07	2,44+0,03	6,92+0,01	3,68+0,06	1215+555025	4138+5841889	7,75+0,36	671+82369
6	CA	4,16+2,25	2,58+0,99	6,67+2,20	3,88+1,15	680+177871	2505+2626411	7,43+1,08	379+39431

	E2F	4,90+0,34	3,14+0,13	7,77+0,24	4,79+0,20	546+70623	2087+892553	9,39+0,02	495+34105
	E2L	5,09+0,73	3,00+0,58	7,68+2,66	4,57+1,31	880+234689	2661+1013339	8,22+1,22	531+42544
	E2P	4,62+1,09	2,88+0,45	6,88+3,57	4,12+1,45	678+270522	2077+1583521	8,13+0,97	421+61195
No Cultivares									
Grupo		LH	AH	LE	AE	VP	NG	DG	PG
1	CA	2,48+0,03	1,43+0,08	3,88+0,11	2,08+0,13	369+90347	1595+2521012	4,42+0,65	103+12053
	E2F	2,49+0,05	1,34+0,07	3,89+0,17	1,96+0,15	602+61752	2517+2767232	4,65+0,72	164+17489
	E2L	2,45+0,03	1,29+0,05	3,77+0,14	1,87+0,11	414+111231	1718+3121091	4,33+0,68	111+17356
	E2P	2,70+0,06	1,60+0,01	4,30+0,02	2,34+0,01	850+81225	4180+1934881	5,50+0,03	296+1600
2	CA	4,98+ 0,48	2,26+0,10	7,52+1,84	3,63+ 0,46	2642+1086027	7278+5113480	4,51+0,89	264+13833
	E2F	4,69+0,12	1,98+0,01	7,37+1,31	3,46+0,03	2682+1990639	6264+10730538	5,08+0,68	248+1999
	E2L	4,36+0,29	1,93+0,01	6,60+2,05	3,13+0,24	2304+1613668	6321+7160118	4,82+0,59	242+1397
	E2P	4,69+0,12	1,98+0,01	7,37+1,31	3,46+0,03	2682+1990639	6264+10730538	5,08+0,68	248+1999
3	CA	3,88+0,90	2,23+0,34	5,74+1,11	3,15+0,47	1168+532179	3935+3452318	6,43+0,72	435+50521
	E2F	4,06+0,01	2,4+0,01	6,26+0,01	3,74+0,04	1233+267806	4260+1060900	6,78+0,33	373+2034
	E2L	3,83+0,21	2,12+0,09	5,64+0,40	3,19+0,33	1190+230954	4121+551898	6,26+0,43	438+26800
	E2P	3,83+0,21	2,12+0,09	5,64+0,4	3,19+0,33	1190+230954	4121+551899	6,26+0,43	438,13+26800