



Journal of Basic & Applied Genetics

(Formerly MENDELIANA)

JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS
REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA



Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX

Included in **SciELO**



BUENOS AIRES - ARGENTINA

OB
A
B

ÍNDICE

4 - 6

Article 1 - opinion

HOW CAN WE FOSTER CROP IMPROVEMENT?

Pontaroli A.C.

7 - 18

Article 2 - opinion

MÉTODOS ESTADÍSTICOS EN GENÉTICA BÁSICA Y APLICADA: POR QUÉ, CÓMO Y CUÁNTO.

Babinec F.J.

19 - 27

Article 3 - research

TAXONOMY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *ASPERGILLUS* SECTION *NIGRI* ISOLATED FROM YERBA MATE IN MISIONES (ARGENTINA)

Castrillo M.L., Fonseca M.I., Bich G.A., Jerke G., Horianski M.A., Zapata, P.D.

28 - 34

Article 4 - research

POLIMORFISMO EN LOS GENES ESTEAROIL-COENZIMA A DESATURASA Y ACIL-COA: DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASA 1 EN EL GANADO SIBONEY DE CUBA

Acosta A., Uffo O., Ronda R., Fernandes Z., Lopes F., Gomes-Filho M.A., Barbosa S.B.P.

35 - 47

Article 5 - research

LA APTITUD COMBINATORIA ESPECÍFICA EN EL MAÍZ (*Zea mays* L. ssp. *mays*) PARA DOBLE PROPÓSITO EN RÍO CUARTO, CÓRDOBA, ARGENTINA.

Di Santo H., Castillo E., Ferreira A., Grassi E., Ferreira V.

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Tapa



Conidióforos de *Aspergillus* section *Nigri*.

Autor: Lorena Castrillo y colaboradores



Bovinos de la raza Siboney de Cuba.

Autor: Atzel Acosta



Ensayos comparativos de rendimiento en trigo.

Autor: Rubén Miranda



HOW CAN WE FOSTER CROP IMPROVEMENT?

Pontaroli A.C.¹

¹Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); CC 276 (7620) Balcarce, Argentina.

apontaroli@balcarce.inta.gov.ar

ABSTRACT

In this paper, the current scenario and challenges that crop improvement faces in response to the increasing world demand for food and biofuels is described. The fact that the rate of improvement in crop performance has plummeted in a number of important crops is discussed. To revert this situation, in my opinion, a truly interdisciplinary approach should be applied to the breeding process, making use of the vast amount of knowledge recently generated in the areas of genomics, ecophysiology, statistics, bioinformatics, etc.. Moreover, a special emphasis should be put on phenotyping which -in my opinion- is the new bottleneck, considering the increasingly fast pace and continuously decreasing costs of genotypic data generation. In the meanwhile, a challenge needs to be faced on how to organize, compile and parse phenotypic data while making them available to the broad scientific community. In conclusion, an unprecedented opportunity for a quantum leap in crop improvement rests before us; now, a concerted effort needs to be done to truly integrate the massive amount of knowledge generated into better crops for the world.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el escenario actual y los desafíos a los que se enfrenta el mejoramiento de cultivos en respuesta a la creciente demanda mundial de alimentos y biocombustibles. Se discute el hecho de que la tasa anual de incremento del rendimiento se ha estancado en los últimos años en algunos de los cultivos más importantes. Para revertir esta situación, en mi opinión, debería aplicarse un verdadero enfoque multidisciplinario al proceso de mejoramiento genético, haciendo uso de los vastos conocimientos generados recientemente en las áreas de genómica, ecofisiología, estadística, bioinformática, entre otras. Además, debería ponerse especial énfasis en la caracterización fenotípica -en mi opinión el nuevo “cuello de botella”- a la luz de la reducción creciente del costo y de la velocidad de generación de datos genotípicos. Mientras tanto, deberá enfrentarse el desafío de compilar y ordenar los datos fenotípicos para su utilización por parte de la comunidad científica. En conclusión, actualmente existen las condiciones para que se produzca un salto cualitativo en el mejoramiento de cultivos; para ello es esencial hacer un esfuerzo concertado y plasmar la gran cantidad de conocimientos generados en mejores cultivos para el mundo.

The fascinating history of crop improvement started with crop domestication, more than 10,000 years ago. Since then, humans have achieved steady increases in crop yield, pest and disease resistance, and quality. Moreover, some breakthroughs as the Green Revolution in the XXth century, greatly influenced the life and fate of millions of human beings. Today, crop improvement has become a key factor for guaranteeing world food security. Aside from the necessary moral debates about the world's food distribution inequity and the use of food products for biofuels, it is unquestionable that world demand for food and biofuels is growing, and will continue to do so, even under the most conservative mid- and long-term prospects (DEXIA, 2010). Therefore, breeders today face the challenge of having to develop ever higher yielding cultivars for increasingly unstable environments, while improving quality and tolerance to biotic and abiotic stresses. Also, agricultural inputs are becoming scarce and/or more expensive, which poses the need for more input-efficient crops. In particular, environmental sustainability must be guaranteed to attain stable crop production and territorial development in the long term.

Over thousands of years since crop domestication, artificial phenotypic selection was the main force leading to the fixation of a number of traits that shape the most distinctive features of modern crops, such as indehiscence of fruits or seeds, ease of threshing, tolerance to high plant density growth, etc. Unlike the empirical nature of this process, modern breeding methodologies were developed starting in the XXth century, which were based on knowledge of statistics and the genetic structure of plant populations. Since then, great progress has been achieved in crop yield, adaptation, resistance to pests and diseases, quality and stability. In the last few years, however, the rate of improvement in crop performance has plummeted in a number of important crops such as wheat and rice (Conforti, 2011). As a result of many years of breeding, several favorable traits, especially those with simple genetic control, have been fixed in elite populations, or they can be easily bred. The challenge now is how to deal more effectively with complex traits such as yield and tolerance to abiotic stress, and how to increase genetic variability for these traits while maintaining agronomic performance.

Indeed, a first approach to tackle the previously mentioned challenge could be to increase the accuracy of phenotyping. Let's apply an example to illustrate the present case. Increasing yield in bread wheat is undoubtedly a paramount objective of every wheat breeding program in the world. We know that yield is controlled by many genes, with a great environmental influence that causes significant genotype x environment interactions. What would happen if we could dissect yield into its physiological components? The concept is far from being new, but a number of recent investigations have provided new insights into the physiological mechanisms responsible for the trait, and on how to perform high throughput determination of relevant variables (see, for example, Reynolds et al., 2012; Abbate et al., 2012; Foulkes et al., 2012). Andrade et al. (2009) have provided other examples of how crop physiology has aided in the elucidation of the genetic control of key traits and their interaction with the environment. Besides crop physiology, modern statistical models, experimental designs and analysis tools undoubtedly have a substantial impact on the quality of field data generation for selection of elite materials, estimation of genetic parameters, phenotyping of mapping populations, etc.

Most remarkably, crop improvement of complex traits can benefit from the true scientific and technological revolution that has taken place over the last 5-10 years in the plant sciences, particularly in the genomics field. With ~40 plant genomes sequenced to date, among which several important crop species are included (CoGePedia, <http://www.genomevolution.org>), and a myriad of bioinformatics, reverse genetics, epigenetics, gene targeting and molecular marker tools available or being developed, one can only envision the potential, unimaginable outcomes of such vast body of information and knowledge when put to the service of crop improvement.

Still, the effects of such "genomics revolution" are, in some crops, materializing less evidently than initially expected. One of the reasons for this, in my opinion, lies on the fact that the pace of genomic data generation largely exceeds that of the other disciplines, and that a truly interdisciplinary approach directed to crop breeding is often lacking. We are now having easier and easier access to information on candidate genes, massive SNP

discovery, whole genome selection tools, association mapping panels, etc, even in minor crops....but we need to make ends meet! No such thing will happen without high quality phenotyping. Current emphasis is being put on phenotyping platforms that allow high-throughput analysis, and although a most valuable tool, the core of success remains in the collaborative, interdisciplinary work. For instance, and to name only some of the key players in this endeavor, breeders know the target, envision the ideotype, deal with the genetic structure of the material under study, can provide insights into the strategy for reaching the target at the fastest pace.... physiologists can provide the rationale for which phenotypic variables to determine and the best way to do it, genomicists can use comparative genomics, transcriptomics, proteomics, etc., to find suitable candidate genes/markers to track...statisticians and bioinformaticians can deal with the way data are generated, collected, and managed effectively. It is clear (and several scientific teams have already put this into practice) that a strong interdisciplinary effort is needed to continue to improve crops as the world

needs. In my opinion, high quality phenotyping is becoming the new bottleneck, as genotyping costs continue to drop. The dramatically fast pace of genomic data generation needs to be accompanied by a similar trend in phenotypic data generation, and a particular emphasis will be needed in figuring out how to organize, compile and parse phenotypic data while making them available to the broad scientific community, as it has been done with genomic data. This is challenging, however, because there is no "common language" in phenotypic data, as it is the case of genomic data. This might change in the near future, as we are starting to see the emergence of such databases and tools, like the Human Phenotype-Genotype Integrator at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/PheGenI>).

In conclusion, an unprecedented opportunity for yet another quantum leap in crop improvement rests before us. Now, we need to make a concerted effort to truly integrate the massive amount of knowledge generated into better crops for the world.

REFERENCES

- Abbate P., Pontaroli A., Lázaro L., Gutheim F. (2012) A method of screening for spike fertility in wheat. *Journal of Agricultural Sciences* (Cambridge) doi:10.1017/S0021859612000068.
- Andrade F., Sala R., Pontaroli A., León A. (2009) Integration of biotechnology, plant breeding and crop physiology. Dealing with complex interactions from a physiological perspective. In: Sadras V., Calderini D. (Eds.) *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy*. Elsevier Science, New York, pp. 267-276.
- Conforti P. (2011) Looking ahead in world food and agriculture: Perspectives to 2050. FAO, Rome, 539 p.
- DEXIA (2010) Food scarcity—trends, challenges, solutions (Sustainability Team Discussion Paper). https://www.dexia-am.com/NR/rdonlyres/392E9422-1E2D-4B01-8083-24EF008DD3D7/0/FOOD_SCARCITY_11_05.pdf.
- Foulkes J., Rivera C., Trujillo E., Sylvester-Bradley R., Slafer G., Reynolds M. (2012) Optimizing harvest index through increased partitioning to the spike and maximizing grain number. In: Reynolds M. (Ed.) *Proceedings of the 2nd International Workshop of the Wheat Yield Consortium*. CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Mexico, pp. 15-16.
- Reynolds M., Pask A., Mullan D. (2012) Physiological breeding I: Interdisciplinary approaches to improve crop adaptation. Mexico, D.F., CIMMYT, 174 p.



MÉTODOS ESTADÍSTICOS EN GENÉTICA BÁSICA Y APLICADA: POR QUÉ, CÓMO Y CUÁNTO

Babinec F.J.¹

¹Estación Experimental Agropecuaria Anguil, INTA
Facultad de Agronomía, UNLPampa.

babinec.francisco@inta.gov.ar / fbabinec@agro.unlpam.edu.ar

“Un hombre con un martillo ve al mundo como un clavo”

Mark Twain

ABSTRACT

This note is an overview of the statistical treatment of research in basic and applied genetics, starting with a brief mention of the types of studies used and their scope, following with some problems in experiments and observational studies, types of variables analyzed and some commonly used methods, and introducing the Bayesian approach. Finally I mention some of the problems currently under study and methodologies used, and give some recommendations at the end.

Key words: experimental design, statistical analysis, Bayesian methods, non-parametrical methods, mixed models, statistical software.

RESUMEN

Se presenta una revisión general del tratamiento estadístico de las investigaciones en genética básica y aplicada, partiendo de una breve mención a los tipos de estudios posibles y su ámbito de aplicación. Se mencionan luego algunos problemas en experimentos y estudios observacionales, tipos de variables analizadas y algunos métodos de uso común, para luego introducir el enfoque bayesiano. Se mencionan finalmente algunos de los problemas bajo estudio actualmente y algunas metodologías empleadas, para dar al final algunas recomendaciones.

Palabras clave: diseño experimental, análisis estadístico, métodos bayesianos, métodos no paramétricos, modelos mixtos, programas estadísticos.

INTRODUCCIÓN

La Genética y la Estadística han estado estrechamente relacionadas en su desarrollo durante el siglo XX (Nelsen, T.C. 2002). Es más, hasta el advenimiento de la revolución molecular, la Genética tenía una profunda impronta probabilística (Fisher, 1918, 1930; Mather, 1938). Algunos de los mayores desarrollos de la Estadística, por otro lado, se deben a genetistas como Henderson y otros (Pianola, 2002; Littell 2011). En verdad, la Estadística ha penetrado toda la investigación en el siglo pasado y se ha convertido en el estilo de pensamiento científico dominante, para usar la terminología de Crombie (*cf.* Hacking, 2007). Pero ello ha implicado también un uso y abuso de las técnicas estadísticas en muchas áreas, como la agronomía (Nelson y Rawlings, 1983; Maindonald, 1984; Dyke 1997), medicina (Altman, 1982), psicología (Hager, 2000), etc. Los problemas encontrados por éstos y otros autores van de la planificación inadecuada de las experiencias a la elección de métodos de análisis inapropiados y la interpretación incorrecta de los resultados, como resume didácticamente Warren (1986). Como reacción, muchas revistas científicas, como por ejemplo el *British Medical Journal*, han publicado series de artículos dedicados a tratar conceptos básicos de estadística y presentar los métodos de análisis más usados en la respectiva disciplina: ejemplos (Platt, (1997, 1998 a, 1998b); recomendaciones (Altman *et al.*, 1983; Bailar y Mosteller, 1988; Wilkinson, 1999; Gould y Steiner, 2003); revisiones (Onofri *et al.*, 2010; van Putten *et al.*, 2010) o puestas al día presentando nuevas metodologías (Matson *et al.*, 1993; Garrett *et al.*, 2004; Machado y Petrie, 2006). Dados los continuos avances en ambas disciplinas, resulta conveniente revisar las aplicaciones más comunes de la estadística a las investigaciones en genética básica y aplicada. A lo largo del tiempo han aparecido revisiones parciales sobre el tratamiento estadístico de datos genéticos (por ej. Fisher, 1952; Lin *et al.*, 1986; Kearsey y Farquhar, 1998; Balding, 2006; Montana, 2006; Terwilliger y Göring, 2009; Balzarini *et al.*, 2011). Esta es una presentación general del tema, para desarrollar en notas posteriores algunas metodologías desde el punto de vista de los problemas más frecuentes a investigar. Somos conscientes de que sólo es posible cubrir una fracción del tema (Potvin y Travis, 1993); la

bibliografía citada es sólo una muestra y refleja el (des)conocimiento del autor sobre la materia.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS E INVESTIGACIONES EN GENÉTICA BÁSICA Y APLICADA

El punto de partida

Muchas de las revisiones sobre empleo de la estadística en distintas disciplinas ponen énfasis en las fallas en el análisis e interpretación. Pero el primer paso donde interviene la estadística en una investigación científica debería ser en la planificación cuidadosa de la experiencia a realizar, sea la elección de los tratamientos, si fuera un ensayo, o de las poblaciones a observar, si fuera un estudio. La diferenciación entre estudios observacionales y experimentos es crucial desde el punto de vista de las inferencias que podrán extraerse finalmente de las diferentes experiencias. En los experimentos el investigador controla ciertas variables o condiciones y puede postular relaciones causa-efecto, mientras que en los estudios observacionales puede identificar factores de riesgo o condiciones predisponentes (Scheiner, 1993). En el caso de la genética, que es básicamente el estudio de la transmisión de características a través de las generaciones (Scheiner, 2010), en general mediante la crianza experimental (Bateson, 1908), la condición experimental está dada por la elección de los progenitores y la determinación del sistema de apareamiento y las progenies (generaciones) segregantes, mientras que en los estudios observacionales será la identificación de las poblaciones caso y control. La elección de los progenitores define la población de referencia, tema objeto de amplio debate (Cockerham, 1980). La relación entre el conjunto de individuos estudiados y la población hacia la cual se hará inferencia lleva a la distinción entre modelos de efectos fijos, cuando el conjunto constituye toda la población de referencia, y aleatorios, cuando son una muestra de la misma. En los modelos mixtos hay una combinación de ambos tipos de efectos (Mc Lean *et al.*, 1991). Otros tipos de estudios son la integración de resultados publicados previamente o meta-análisis y el análisis de bases de datos.

La técnica experimental

Se trate de experimentos o estudios, hay cuestiones comunes en su planificación, como la determinación del tamaño de muestra necesario para estimar una proporción o para representar una población (Hanson, 1959) o el número de replicaciones (Geng y Hills, 1978; Gauch y Zobel, 1996). La evaluación imparcial de las progenies segregantes requiere del diseño de experimentos apropiados, que cumplan los requisitos de replicación, aleatorización y control local establecidos por Fisher (1960; ver también White, 1984; St-Pierre, 2007; Eskridge 2009). Desde el advenimiento de los ensayos en bloques se han registrado avances tanto en la generación de nuevos diseños para elevado número de tratamientos (Edmondson, 2005; Eskridge, 2009) como en la incorporación de nuevas técnicas de análisis (Lawson y Cressie, 2000; Piepho *et al.*, 2003, 2004; Payne, 2006; Hua y Spilke, 2011). Algunos de los problemas que pueden aparecer en las estimaciones de parámetros genéticos en plantas vinculados con el diseño y la técnica experimentales han sido revisados por Moll y Robinson (1967), Dudley y Moll (1969) y Holland *et al.* (2003), entre otros. Un aspecto que no siempre es tenido en cuenta es la vinculación entre el sitio experimental u observacional y el universo al que se desea inferir (Templeman, 2009). Los estudios a nivel molecular plantean nuevas dificultades tanto en diseño como en análisis (Churchill, 2002; Quackenbush, 2002; Rosa *et al.*, 2005; para citar algunos).

Variables y análisis

El objetivo de una experiencia es la recolección de datos sobre los individuos estudiados y su interpretación. Según respondan a características preexistentes u observadas durante la marcha de la experiencia o al final de la misma, hablamos de variables clasificatorias, predictivas, explicativas o independientes y/o de covariables, y de variables respuesta o dependientes, aunque esta distinción es difusa en muchas oportunidades. En ocasiones, las variables registradas son sólo una aproximación al verdadero sujeto de estudio, o una construcción mental, como el rendimiento. Las variables, sean dependientes o independientes, pueden tomar

sólo dos valores (binarias) o varios (categóricas, nominales) siguiendo a veces un orden (ordinales) o pueden tomar cualquier valor en una escala numérica (continuas). Esta clasificación sigue en gran parte la terminología introducida por Stevens (1946), quien tuvo en cuenta el efecto de distintas transformaciones sobre el monto de información que contenía cada variable. Una transformación es “permisible” o “admisible” en la medida que preserva dicho monto. Posteriormente, la extensión de estos conceptos a los métodos de análisis (Stevens, 1951, citado por Velleman y Wilkinson, 1993) dio lugar a la presentación en varios textos de tablas de métodos “admisibles”, que son seguidas a veces como un canon que estipula los únicos modos posibles de analizar los datos obtenidos, en función de la escala en la que están medidas las variables de interés, sin tener en cuenta el continuo desarrollo de nuevos métodos estadísticos, y la revisión de otros ya establecidos (Cohen, 2001). Un caso especial es el de los datos de supervivencia o confiabilidad (censurados a la derecha) que han dado lugar al desarrollo de métodos específicos (Cox, 1972). Un ejemplo de lo complejo que resulta discernir el tipo de variable medida está dado por la resistencia a enfermedades, que si bien se registra siguiendo escalas más o menos aceptadas, presenta en muchos casos una suerte de *continuum* en la magnitud de las lesiones observadas.

El análisis estadístico

El primer paso del análisis, como se enseña en los cursos de estadística aplicada, es realizar un análisis exploratorio a fin de detectar valores extraños debidos a observaciones erróneas u otros accidentes experimentales (Platt, 1998b). A las herramientas gráficas disponibles (histogramas, gráficos de caja, de tallo y hoja, de dispersión, etc.) pueden sumarse algunas técnicas analíticas como el análisis de correlación, y ciertos métodos multivariados como los análisis de componentes principales y de correspondencia, que permiten la reducción de dimensiones, algo necesario cuando hay muchas variables respuesta medidas.

El análisis estadístico puede verse como la búsqueda de un modelo, o sea, el ajuste de los datos obtenidos a alguna distribución teórica. Dicho de

otro modo, se busca explicar la variabilidad presente en la variable respuesta, separándola en partes que pueden ser explicadas de otras que no pueden serlo, lo que es la base del análisis de varianza (ANOVA). La estadística aplicada se basa en la estimación de parámetros y en la prueba de hipótesis, debidas a R. Fisher y a J. Neyman y E. Pearson, respectivamente; ambos casos requieren cumplimentar algunos supuestos, en particular sobre la distribución de la parte no explicada por el modelo propuesto. Estos supuestos, que en sí son condiciones indemostrables (Mead, 1990), se refieren tanto a la independencia de las observaciones como a la distribución de los valores observados y/o de los residuales del modelo, o sea de la fracción no explicada por el mismo. Algunas técnicas, como el ANOVA, requieren una distribución normal (gaussiana) de los residuales, a diferencia de otras a las que se denomina no-paramétricas o de distribución libre. El estudio de los residuales puede llevarnos a transformar la escala de la variable respuesta, de la explicativa, o de ambas, para ajustar una distribución normal de los mismos (Fernández, 1992), o a la opción de métodos no paramétricos (Potvin y Roff, 1993) o al empleo de modelos mixtos (Paterson y Lello, 2003; Piepho, 2003; 2004) o generalizados (Paterson y Lello, 2003; Bolker *et al.*, 2008), en lugar del tradicional ANOVA.

La Tabla 1, adaptada de Motulsky (1995) y de Tabachnick y Fidell (2000) presenta algunos de los métodos más usados en función de los objetivos de la investigación, de la escala en la que son registradas las variables observadas y de su condición, esto es, su jerarquía dentro de las hipótesis de trabajo y de si están bajo control del investigador o no. Estos métodos se estudian en la mayor parte de los cursos de estadística aplicada en programas de grado y posgrado, pero son sólo una parte de una batería muy extensa de pruebas disponibles para tratar distintas situaciones y por ello estas tablas sólo son orientativas. El libro de Sheskin (2011) en su quinta edición, contiene más de 300 pruebas estadísticas para análisis uni y bivariados.

A consecuencia de la existencia cada vez más frecuente de grandes bases de datos generadas por el instrumental de laboratorio disponible (Kahn, 2011) y el continuo desarrollo de nuevas metodologías, vemos una constante renovación de los métodos aplicados (Wang *et al.*, 2011), algunos con nombres

sugestivos como redes neuronales o árboles de decisión entre otros (Niederberger, 1996; Sanogo y Yang, 2004). Ciertos métodos basados en el uso intensivo de los datos, llamados de remuestreo (*resampling, bootstrapping, jackknife*) han ganado popularidad dado el avance en la capacidad de cálculo de las computadoras personales (Yu, 2003).

La mirada Bayesiana

En los últimos años el enfoque bayesiano ha ganado espacio frente al tradicional o frecuentista, sobre todo en áreas de la medicina y de la economía, pero también en ecología (Reckhow, 1990; Dennis, 1996 y trabajos allí citados) y en agronomía (Mila y Carriquiry, 2004; Edwards y Jannick, 2006; Costes *et al.*, 2006). Para explicar la diferencia con el enfoque clásico o frecuentista seguiremos a Gajewski y Simon (2008). Los métodos bayesianos permiten combinar la información previa con los datos observados. La información previa puede obtenerse de estudios realizados previamente o de opinión experta. Partiendo del teorema de Bayes

Información total = Información histórica + Datos

que en la literatura bayesiana vemos mencionar como “distribución posterior”, “verosimilitud (*likelihood*)” y “distribución previa (*prior*)”, respectivamente. Vemos que el análisis (posterior) es una combinación del conocimiento del investigador sobre el fenómeno bajo estudio antes de realizar la experiencia con los que se aprende de los datos obtenidos al concretarla. En el análisis clásico

Información total = Datos

la información previa no juega ningún rol, y sólo se tienen en cuenta los datos. Conceptualmente, en ausencia de información previa, ambos modos de analizar brindan los mismos resultados. Dicho de otro modo, el enfoque bayesiano nos permite actualizar el conocimiento existente con nueva información. En teoría, es una alternativa simple a la inferencia estadística conocida a partir de la distribución posterior. Pero en la práctica, esta sólo puede obtenerse analíticamente en casos muy sencillos, y la solución sólo puede obtenerse

computacionalmente usando métodos de simulación (Monte Carlo principalmente), generando muestras de la distribución posterior y estimando los parámetros de interés a partir de las mismas. Dos aspectos cruciales son la elección de la distribución previa y si se alcanza o no la convergencia; en caso de elección de una distribución previa inadecuada o de no llegar a la convergencia, las inferencias son tanto imprecisas como confusas o directamente erróneas (Christensen 2005).

Ambos enfoques, clásico o frecuentista y bayesiano, tiene sus pros y contras. Usando un punto de vista pragmático (Chatfield, 2002) la elección depende del objetivo: si se dispone de información previa que se quiere incorporar al análisis, lo indicado sería usar un método bayesiano, que tiene la ventaja de presentar resultados en términos de probabilidad más accesibles. El enfoque bayesiano permite responder cuestiones específicas mejor que un estimador puntual clásico. Pero si se está interesado en la estimación de parámetros, aún en casos complejos, no es necesario recurrir a métodos bayesianos (SAS Institute, 2008). Pero una mirada más rigurosa (Dennis, 1996) enfatiza que la adopción de uno u otro enfoque implica una distinta filosofía de la ciencia en cada caso, y la adopción o rechazo de ciertos conceptos centrales como el rol de la aleatorización, valores de p e intervalos de confianza. Una introducción interesante al uso de métodos bayesianos y su aplicación en epidemiología se encuentra en Greenland (2006; 2007); véase también el artículo de Cressie *et al.* (2009) y la discusión subsiguiente en la revista *Ecological Applications*, y la sección “Bayesian Analysis: Advantages and Disadvantages” en el manual de SAS (2008).

Programas estadísticos

La revolución estadística se ha visto complementada, posibilitada y potenciada por la disponibilidad de programas de computación que permiten aplicar a cualquier conjunto de datos los métodos reseñados. Los hay gratuitos y disponibles en la Web, para uso en bioestadística como el Epi-Info (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>) o el G-Stat (www.g-stat.es/),

algunos específicos para métodos no paramétricos (MSTAT, <http://mcardle.oncology.wisc.edu/mstat>), otros concebidos para las necesidades de programas de mejoramiento genético vegetal (Crop-Stat, www.irri.org), o para investigaciones en genética como el InfoGen en su versión estudiantil (www.info-gen.com.ar, Balzarini y Di Rienzo, 2011). Otros permiten un gran número de análisis a través de comandos organizados en “scripts” y son onerosos como SAS (www.sas.com) o GenStat y AS-REML (<http://www.vsnl.co.uk/>) o gratuitos como R (www.r-project.org/). El programa WinBUGS (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/>) es el más usado para aplicar métodos bayesianos. Escapa a esta reseña la mención de los programas específicos para los estudios a nivel molecular por su número y rápida evolución. La variedad de métodos disponibles en los programas estadísticos y la facilidad de su uso, en muchos casos lleva a un análisis impropio y a una interpretación equivocada de la información contenida en los datos (Appleton, 1995c). Para un uso eficiente es necesario reconocer la estructura subyacente en los mismos (Appleton, 1995a; 1995b), y elegir los programas estadísticos para cubrir las necesidades reales de análisis que enfrentamos a partir de un estudio integral de los mismos (Li *et al.*, 2011).

Algunos problemas actuales

Algunos temas de la investigación en genética básica y aplicada y su correspondiente análisis estadístico han recibido un tratamiento intensivo en los últimos 25 años (Carbonell y Bramardi, 2001; Gianola, 2001). El primero de ellos, en un orden arbitrario, es la interacción genotipo x ambiente, que constituye un desafío constante para el desarrollo de nuevas variedades (Annichiarico, 2002). El análisis de series de experimentos a escala regional, nacional, e incluso mundial, en base a métodos uni y multivariados (Yue *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1998) ha dado lugar a un continuo avance en el mejoramiento genético y a establecer nuevos conceptos como el de mega-ambientes (Gauch y Zobel, 1997). Los estudios a nivel molecular (Speed y Zhou, 2009, y otros trabajos incluidos

en ese número de *Statistical Methods in Medical Research*) han generado inmensas bases de datos cuyo análisis requiere desarrollar nuevos métodos (Terwilliger y Göring, 2009; Kahn, 2011; Ogutu *et al.*, 2012). Un aspecto que no puede pasarse por alto es la dificultad en replicar los resultados de este tipo de estudios (Ioannidis *et al.* 2008). La búsqueda de nuevas fuentes de germoplasma y la caracterización de las colecciones de poblaciones y razas implican un adecuado estudio de la diversidad usando distintas técnicas multivariadas (Hu *et al.*, 2000; Carbonell y Bramardi, 2001; Balzarini *et al.*, 2011). El mejoramiento animal también ha generado grandes masas de datos, cuyo análisis requirió el desarrollo de nuevos conceptos como el de BLUPs (predictores insesgados) y de métodos tales como los modelos mixtos, que luego se han generalizado (Pianola, 2001; Littell, 2011). Puede verse que la dirección actual es la integración de información de distintas fuentes y el tratamiento de grandes bases de datos.

Coda

El paso final de toda investigación es la presentación de los resultados y su interpretación en congresos o en trabajos publicados en revistas científicas y luego de divulgación, si cabe. El uso de tablas, gráficos y figuras (Wainer, 1992) permite una comprensión rápida, aunque en la práctica suele estar limitado al empleo de gráficos de barras o de dispersión sin medidas del error (Cooper *et al.*, 2002) generados por hojas de cálculo, con sus limitaciones (Vidmar, 2007). Cada instancia de publicación tiene sus normas propias, pero hay buenas guías que pueden seguirse, sobre todo para la presentación gráfica (Yandell, 2007). La disponibilidad de herramientas y sobre todo de conceptos y guías sobre comunicación efectiva (Pocock *et al.*, 2008) deberían permitirnos presentar claramente nuestros resultados y conclusiones.

OBJETIVO	DATOS ANALIZADOS			
	CONTINUOS	ORDINALES	BINARIOS	SUPERVIVENCIA
Describir un grupo	Media, Desvío	Media, Rango IQ	Proporción	Curva Kaplan-Meier
Comparar con un valor teórico	t Student	Wilcoxon	Chi cuadrado Prueba binomial	?
Comparar dos grupos independientes	t Student muestras independientes	Mann-Withney	Fisher Chi cuadrado	Log-rank test Mantel-Haenzsel
Comparar + de 2 grupos independientes	ANOVA a una vía	Kruskal-Wallis Jonckheere-Terpstra	Chi cuadrado	Regresión de Cox
Comparar 2 grupos relacionados	t Student muestras apareadas	Wilcoxon	McNemar	Regresión de riesgos proporcionales
Comparar + de 2 grupos relacionados	ANOVA a dos vías	Friedman	Q Cochran	?
Asociación entre 2 variables	Correlación Pearson	Correlación Spearman	Coefficientes contingencia	?
Predecir 1 variable	Reg linear/no linear simple/múltiple	Reg no paramétrica Sen-Adichie	Reg logística	Regresión de Cox
Asociación entre + de 2 variables	Correlación canónica	?	Análisis de frecuencias multivía	?
Establecer una estructura	Componentes principales Modelos de ecuaciones estructurales	Análisis de correspondencia		?
Asignar observaciones a grupos	Análisis discriminante	?	Análisis logit	?
Establecer una clasificación	Técnicas de agrupamiento			?

Tabla 1. Sinopsis de los métodos estadísticos más usados, adaptada de Motulsky (1995) y de Tabachnick y Fidell (2000). Ver texto para definiciones y métodos alternativos.

CONCLUSIÓN

¿Significa todo esto que debemos conocer y/o emplear todos los métodos? En modo alguno. Después de todo, si entendemos qué implica hablar de media o mediana, desvío (y error estándar) o rango, e intervalo de confianza, y sabemos cuándo usar chi cuadrado, t de Student, regresión lineal y ANOVA, podemos entender la mayor parte de los trabajos publicados (Reed *et al.*, 2003; Al-Benna *et al.*, 2010). Pero es necesario que los investigadores sean conscientes de las alternativas disponibles, y elijan la metodología de análisis con criterio amplio.

Citando un manual de 1992 de la Auditoría estadounidense (*US General Accounting Office*), para que una investigación sea fructífera se requiere (1) la comprensión de una amplia gama de métodos de análisis de datos, (2) la planificación temprana de la forma en que se analizarán los datos y la revisión de los métodos a medida que el trabajo avanza, (3) identificar cuáles métodos responden mejor a las preguntas formuladas en el estudio, dados los datos obtenidos, y (4) una vez que el análisis ha finalizado, reconocer cómo las debilidades presentes en los datos y/o en el análisis afectan las conclusiones que se han extraído (traducción libre del autor). Hoy es posible para cualquier investigador poner a prueba mediante simulación la metodología de análisis empleada y otras alternativas (MacArdle y Anderson 2004). Conviene tener presente que no todos los hallazgos y descubrimientos informados son luego confirmados, sea por una planificación indecuada, una técnica experimental imperfecta o un análisis incorrecto (*cf.* Begley y Ellis 2012).

AGRADECIMIENTOS

Mi interés en este tema proviene de sendos cursos dictados por María Inés Oyarzábal y Jorge Mariotti hace tiempo. Una versión previa fue leída y comentada por Valeria Borelli y Valeria Paccapelo, y Elsa Camadro me estimuló a concluirlo. Los errores, omisiones y arbitrariedades son responsabilidad mía.

Varias ideas provienen de una presentación a una mesa redonda organizada por Martín Grondona en el seno del Grupo Argentino de Biometría en 2006.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Benna S., Al-Ajam Y., Way B., Steintraesser L. (2010) Descriptive and inferential statistical methods used in burns research. *Burns* 36: 343-346.
- Altman D. (1982) Statistics in medical journals. *Stat. Med.* 1: 59-71.
- Altman D.G., Gore S.M., Gardner M.J., Pocock S.J. (1983) Statistical guidelines for contributors to medical journals. *BMJ* 286: 1489-1493.
- Annicchiarico P. (2002) Genotype x environment interactions. Challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations. *FAO Plant Production and Protection Paper* 174.
- Appleton D.R. (1995a, b, c) Pitfalls in the interpretation of studies: I, II, III. *J. Roy. Soc. Med.* 88: 2-4, 188-190, 241-243.
- Bailar J.C., Mosteller F. (1988) Guidelines for statistical reporting in articles for medical journals. *Ann. Int. Med.* 108: 266-278.
- Balding D.G. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews Genetics* 7: 781-791.
- Balzarini M., Di Rienzo J. (2011) InfoGen versión 2011. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Balzarini M., Teich I., Bruno C., Peña A. (2011) Making genetic biodiversity measurable: A review of statistical multivariate methods to study variability at gene level. *Rev. FCA UNCuyo* 43: 261-275.
- Bateson W. (1908) The methods and scope of Genetics. Cambridge University Press. (<http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/holdings/b/wb-methods-08.pdf>)

- Begley C.G., Ellis L.M. (2012) Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483: 531-533,
- Bolker B.M., Brooks M.E., Clark C.J., Geange S.W., Poulsen J.H., Stevens H.H., White J.S.S. (2008) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 127-135.
- Carbonell E.A., Bramardi S.J. (2001) La Estadística en la Investigación Genética Vegetal. XXIX Coloquio de la Sociedad Argentina de Estadística. Neuquén, UNComahue, 16 pp.
- Chatfield C. (2002) Confessions of a pragmatic statistician. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)* 51: 1-20.
- Christensen R. (2005) Testing Fisher, Neyman, Pearson and Bayes. *The American Statistician* 59:121-126.
- Churchill G.A. (2002) Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature Genetics* 32: 490-495.
- Cockerham C.C. (1980) Random and fixed effects in plant genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 56: 119-131.
- Cohen M.E. (2001) Analysis of ordinal dental data: Evaluation of conflicting recommendations. *J. Dent. Res.* 80 (1): 309-313.
- Cooper R.J., Schriger D.L., Close R.J.H. (2002) Graphical literacy: The quality of graphs in a large-circulation journal. *Ann. Emer. Med.* 40: 317-322.
- Costes J.M., Crossa J., Sanches A., Cornelius P.L. (2006) A Bayesian approach for assessing the stability of genotypes. *Crop Sci.* 46: 2654-2665.
- Cox D.R. (1972) Regression models and life tables (with Discussion). *J. R. Stat. Soc. A.* 148: 82-117.
- Cressie N.A., Calder C.A., Clark J.S., Van Hoef J.M., Wikle C.K. (2009) Accounting for uncertainty in ecological analysis: the strengths and limitations of hierarchical statistical modeling. *Ecological Applications* 19: 553-570.
- Dennis B. (1996) Discussion: Should ecologists become Bayesians?. *Ecological Applications* 6: 1095-1103.
- Dudley J.W., Moll R.H. (1969) Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances in plant breeding. *Crop Sci.* 9: 257-262.
- Dyke G.V. (1997) How to avoid bad statistics. *Field Crops Research* 51 (3): 165-187.
- Edmondson R.N. (2005) Past developments and future opportunities in the design and analysis of crop experiments. *Journal of Agricultural Science* 143: 27-33.
- Edwards J.D., Jannick J.L. (2006) Bayesian modeling of heterogeneous error and genotype x environment interaction variances. *Crop Sci.* 46: 820-833.
- Eskridge K.M. (2009) Field Trial designs in plant breeding. The Illinois maize breeding and genetics laboratory. <http://imbg1.cropsci.illinois.edu/school/presentations/2009/Eskridge.pdf>.
- Fernández G. (1992) Residual analysis and data transformations: Important tools in statistical analysis. *HortScience* 27: 297-300.
- Fisher R.A. (1918) The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. R. Soc. Edinb.* 52: 399-433.
- Fisher R.A. (1930) The genetical theory of natural selection. Oxford Clarendon Press, Oxford.
- Fisher R.A. (1952) Statistical methods in genetics. *Heredity* 6: 1-12.

- Fisher R.A. (1960) The design of experiments, Seventh Edition. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Flores F., Moreno M.T., Cubero J.I. (1998) A comparison of univariate and multivariate methods to analyze environments. *Field Crops Res.* 56: 271-286.
- Gajewski B.J., Simon S.D. (2008) A one-hour training seminar on bayesian statistics for nursing graduate students. *The American Statistician* 62: 190-194.
- Garrett K.A., Madden L.V., Hughes G., Pfender W.F. (2004) New applications of statistical tools in plant pathology. *Phytopathology* 94: 999-1003.
- Gauch H.G., Zobel R.W. (1996) Optimal replication in selection experiments. *Crop Sci.* 36: 838-843.
- Gauch H.G., Zobel R.W. (1997) Identifying mega-environments and targeting genotypes. *Crop Sci.* 37: 311-326.
- Geng S., Hills F.J. (1978) A procedure for determining numbers of experimental and sampling units. *Agronomy Journal* 70: 441-444.
- Gianola D. (2001) Statistics in animal breeding. In: Raftery A.E., Tanner M.A., Wells M.T. (Eds) "Statistics in the 21st Century". Chapman&Hall/CRC, Boca Raton, pp. 34-41.
- Gianola D. (2002) Los métodos estadísticos en el mejoramiento genético. In: Cardellino R., Cardellino R. (Eds.) "Genética Animal: Contribuciones en homenaje al Profesor Ing. Agr. Jaime Rovira". Hemisferio Sur, Montevideo, pp. 61-90. http://www.ansci.wisc.edu/facstaff/Faculty/pages/gianola/genetic_improvement.pdf
- Gould W.R., Steiner R.L. (2003) Viewpoint: Improving range science through the appropriate use of statistics. *J. Range Manage.* 55: 526-529.
- Greenland S. (2006) Bayesian perspectives for epidemiological research: I. Foundations and basic methods. *Int. J. Epidemiol.* 35: 765-775.
- Greenland S. (2007) Bayesian perspectives for epidemiological research: II. Regression analysis. *Int. J. Epidemiol.* 36: 195-202.
- Hacking I. (2007) The laboratory style of thinking and doing. A lecture at the Science, Technology and Society Workshop, National Tsing Hua University Monday 12th November 2007 (Accessed 04/05/09).
- Hager W. (2000) About some misconceptions and the discontent with statistical tests in psychology. *Methods of Psychological Research Online*, 5: 1-31. <http://www.psychologie.de/fachgruppen/methoden/mpr-online/issue9/art1/hager.pdf>
- Hanson W.D. (1959) Minimum Family Sizes for the Planning of Genetic Experiments. *Agronomy Journal* 51: 711-715.
- Holland J.B., Nyquist W.E., Cervantes-Martinez C.T. (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: An update. In: Janick J. (Ed.) *Plant breeding reviews*. Wiley, New York, Vol. 22, pp. 9-111.
- Hu J., Zhu J., Xu H.M. (2000) 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.
- Hua X., Spilke J. (2011) Variance-covariance structure and its influence on variety assessment in regional crop trials. *Field Crops Research* 120: 1-8.
- Ioannidis J.P.A., Allison D.B., Ball C.A., Coulibaly I., Cui X, Culhane A.C., Falchi M, Furlanello C., Game L., Jurman G., Mangion J., Mehta T., Nitzberg M, Page G.P, Petretto E., van Noor V.(2012) Repeatability of published microarray gene expression analyses. *Nature Genetics* 41:149-155.
- Kahn S.D. (2011) On the future of genomic data. *Science* 331: 728-729.

- Kearsey M.J., Farquhar A.G.L. (1998) QTL analysis in plants; where are we now?. *Heredity* 80: 137-142.
- Lawson A.B., Cressie N. (2000) Spatial statistical methods for environmental epidemiology. In: *Handbook of Statistics*, Vol 18, pp. 357-396. Elsevier, Holanda
- Li B., Lingsma H.F., Steyerberg E.W., Lesaffre E. (2011) Logistic random effects regression models: a comparison of statistical packages for binary and ordinal outcomes. *BMC Medical Research Methodology* 11: 77 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2288/11/77>, accessed 26/03/2011).
- Lin C.S., Binns M.R., Lefkovich L.P. (1986) Stability analysis: Where do we stand?. *Crop Sci.* 26: 894-900.
- Littell R.C. (2011) The evolution of linear models in SAS: A personal perspective. Paper 325-2011, SAS Global Forum 2011.
- MacArdle B.H., Anderson M.J. (2004) Variance heterogeneity, transformations, and models of species abundance: a cautionary tale. *Can. J. Fish- Aquat. Sci.* 61:1294-1302.
- Machado S., Petrie S.R. (2006) Symposium-Analysis of unreplicated experiments-Introduction. *Crop Sci.* 46: 2474-2475.
- Maindonald J.H. (1984) Use of statistical evidence in some recent issues of DSIR agricultural journals. *NZ J. Agric. Res.* 27: 597-610.
- Mather K. (1938) The measurement of linkage in heredity. Methuen, London.
- Matson P., Potvin C., Travis J. (1993) Statistical methods: An upgrade for ecologists. *Ecology* 74: 161-161.
- McLean R.A., Sanders W.L., Stroup W.W. (1991) A unified approach to mixed linear models. *The Am. Stat.* 45: 54-64.
- Mead R. (1990) The design of experiments. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Mila A.L., Carriquiry A.L. (2004) Bayesian analysis in plant pathology. *Phytopathology* 94: 1027-1030.
- Moll R.H., Robinson H.F. (1967) Quantitative genetic investigations of yield of maize. *Der Züchter* 37: 192-205.
- Montana G. (2006) Statistical methods in genetics. *Briefings in Bioinformatics* 7: 297-308.
- Motulsky H.J. (1995) *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press, New York.
- Nelson L.A., Rawlings J.O. (1983) Ten common misuses of statistics in agronomic research and reporting. *J. Agron. Educ.* 12: 100-105.
- Niederberger C. (1996) Computational tools for the modern andrologist. *J. Androl.* 17: 462-466.
- Nelsen T.C. (2002) The state of statistics in agricultural science. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7: 313-319.
- Ogotu J.O., Schulz-Streeck T., Piepho H.P. (2012) Genomic selection using regularized linear regression models: ridge regression, lasso, elastic net and their extensions. *BMC Proceedings* 2012, 6 (Suppl 2): S10.
- Onofri A., Carbonell E.A., Piepho H.P., Mortimer A.M., Cousens R.D. (2010) Current statistical issues in Weed Research. *Weed Research* 50: 5-24.
- Paterson S, Lello J (2003) Mixed models: getting the best use of parasitological data. *Trends in Parasitology* 19:370-375.
- Payne R.W. (2006) New and traditional methods for the analysis of unreplicated experiments. *Crop Sci.* 46: 2476-2481.

- Piepho H.P., Büchse A., Emrich K. (2003) A hitchhiker's guide to the mixed model analysis of randomized experiments. *Journal of Agronomy and Crop Science* 189: 310-322.
- Piepho H.P., Büchse A., Richter C. (2004) A mixed modelling approach for randomized experiments with repeated measures. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190: 230-240.
- Platt R.W. (1997) Logistic regression and odds ratios. *Inj. Prev.* 3: 294.
- Platt R.W. (1998a) ANOVA, t tests, and linear regression. *Inj. Prev.* 4: 52-53.
- Platt R.W. (1998b) Exploratory analysis: what to do first. *Inj. Prev.* 4: 140.
- Pocock S., Travison T., Wruck L. (2008) How to interpret figures in reports of clinical trials. *BMJ* 336 (7654): 1166-1169.
- Potvin C., Roff D. (1993) Distribution-free and robust statistical methods: Viable alternatives to parametric statistic. *Ecology* 74: 1617-1628.
- Potvin C., Travis J. (1993) Concluding remarks: A drop in the ocean... *Ecology* 74: 1674-1676.
- Quackenbush J. (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics* 32: 496-501.
- Reckhow K.H. (1990) Bayesian inference in non-replicated ecological studies. *Ecology* 71: 2953-2059.
- Reed J.F., Salen P., Bagher P. (2003) Methodological and statistical techniques: What do residents really need to know about statistics? *J. Med. Syst.* 27: 233-238.
- Rosa G.J., Steibel J.P., Tempelman R.J. (2005) Reassessing design and analysis of two-colour microarray experiments using mixed effects models. *Comp. Funct. Genomics* 6 (3): 123-31.
- Sanogo S., Yang X.B. (2004) Overview of selected multivariate statistical methods and their use in phytopathological research. *Phytopathology* 94: 1004-1006.
- SAS Institute Inc (2008) Introduction to Bayesian Analysis Procedures. In: *SAS/STAT 9.2 User's Guide*, Ch. 7. SAS Institute, Inc., Cary, NC. pp. 141-179.
- Scheiner S.M. (1993) Introduction: Theories, Hypotheses, and Statistics. In: Scheiner S.M., Gurevitch J. (Eds.) *Design and Analysis of Ecological Experiments*, Chapman and Hall, New York, NY, pp. 1-13.
- Scheiner S.M. (2010) Toward a conceptual framework for biology. *The Quarterly Review of Biology* 85: 293-318.
- Sheskin D. (2011) *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures* Fifth ed. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- Speed T., Zhao H. (2009) Microarrays. *Stat Methods Med. Res.* 18 (6): 531-532.
- Stevens S.S. (1946) On the theory of scales of measurement. *Science, New Series*, Vol. 103: 677-680.
- St-Pierre N.R. (2007) Design and analysis of pen studies in the animal sciences. *J. Dairy Sci. (E. Suppl)* 90: E87-E99.
- Tabachnick B.G., Fidell L.S. (2000) *Using Multivariate Statistics*, Fourth Edition. Allen and Bacon, New York.
- Tempelman R.J. (2009) Assessing experimental designs for research conducted on commercial dairies. *Journal of Dairy Science* 92: 1-15.
- Terwilliger J.D., Göring H.H.H. (2009) Gene mapping in the 20th and 21st centuries: Statistical methods, data analysis, and experimental design. *Human Biology* 81: 663-728.

- US General Accounting Office (1992) Quantitative data analysis: An introduction. Transfer paper 10.1.11. (<http://www.gao.gov/assets/80/76118.pdf>).
- van Putten B., Knippers T., Buurman P. (2010) On design and statistical analysis in soil treatment experiments. *Soil Science* 175: 519-529.
- Velleman P.F., Wilkinson L. (1993) Nominal, ordinal, interval, and ratio typologies are misleading. *Am. Statistician* 47: 65-72.
- Vidmar G. (2007) Statistically sound distribution plots in Excel. *Metodološki Zvezki* 4: 83-98.
- Wainer H. (1992) Understanding graphs and tables. *Educational Researcher* 21: 14-23.
- Wang D., Eskridge K.M., Crossa J. (2011) Identifying QTLs and epistasis in structured plant populations using adaptive mixed lasso. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 16: 170-184.
- Warren W.G. (1986) On the presentation of statistical analysis: reason or ritual. *Can. J. For. Res.* 16: 1185-1193.
- White T.L. (1984) Designing nursery experiments. In: Duryea M.L., Landis T.D. (Eds.) *Forest nursery manual: Production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster, for Forest Research Laboratory, Oregon State University. Corvallis. 386 pp. Chapter 28.
- Wilkinson L., APA Task Force on Statistical Inference (1999) Statistical methods in psychology journals: guidelines and explanations. *American Psychologist* 54: 594-604.
- Yandell B.S. (2007) Graphical data presentation, with emphasis on genetic data. *Hort. Science* 42: 1047-1051.
- Yu C.H. (2003) Resampling methods: concepts, applications, and justification. *Practical Assessment, Research & Evaluation* 8 (19). Accessed December 1, 2005.
- Yue G.L., Roozeboom K.L., Schapaugh W.T., Liang G.H. (1997) Evaluation of soybean cultivars using parametric and nonparametric stability estimates. *Plant Breed.* 116: 271-275.



TAXONOMY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *ASPERGILLUS* SECTION *NIGRI* ISOLATED FROM YERBA MATE IN MISIONES (ARGENTINA)

Castrillo M.L.^{1*}, Fonseca M.I.¹, Bich G.A.¹, Jerke G.¹,
Horianski M.A.¹, Zapata, P.D.¹

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular. Módulo de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.
Av. Mariano Moreno 1375. CP 3300. Posadas, Misiones, Argentina. Tel. +54 376 4427687.

* mlc_827@hotmail.com

ABSTRACT

Members of *Aspergillus* section *Nigri* are distributed worldwide and are potentially ochratoxin A producers; some of them are used at industrial level as source of extracellular enzymes and organic acids. The taxonomy of this section comprises one of the most complex and confusing of genus *Aspergillus*. The objectives of present work were to study the phylogeny of *Aspergillus* section *Nigri* and their taxonomy by amplifying ITS1, 5.8S and ITS2 regions. We analyzed 14 strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from different commercial forms of yerba mate, classified according to morphology. Genomic DNA was extracted, the ITS regions were amplified with universal primers ITS1 and ITS4, and the obtained fragments were sequenced. The obtained sequences were aligned and edited to a size of 532bp, to carry out phylogenetic analyses using TNT program. We used 100 RAS+TBR cycles to search for the most parsimonious tree, which was supported by bootstrap and Jackknife with 1000 resampled matrices. From the analysis of parsimony, one hundred trees were obtained with 568 steps. Bootstrap and Jackknife analyses exhibited similar topology and minor differences in their supported values, showing that section *Nigri* is distributed in two general clusters: one composed of *A. niger*, *A. carbonarius* and *A. heteromorphus* clades, and the other composed of *A. aculeatus* and *A. homomorphus* clades, separated from different sections of genus *Aspergillus*.

Key words: *Aspergillus* section *Nigri*; taxonomy; ribosomal DNA

RESUMEN

Las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* están distribuidas mundialmente y son consideradas potenciales productores de ocratoxina A; algunas de ellas se usan a nivel industrial como fuentes de enzimas extracelulares y ácidos orgánicos. La taxonomía de esta sección comprende una de las más complejas y confusas del género *Aspergillus*. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la filogenia de *Aspergillus* sección *Nigri* y su taxonomía mediante la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2. Analizamos 14 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes formas comerciales de yerba mate, clasificadas de acuerdo a su morfología. Se extrajo ADN genómico, las regiones ITS fueron amplificadas con los cebadores universales ITS1 e ITS4, y los fragmentos obtenidos fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas a un tamaño de 532pb, para realizar un análisis filogenético con el programa TNT. Para averiguar el árbol más parsimonioso, usamos 100 ciclos RAS+TBR, respaldados con 1000 repeticiones por análisis Bootstrap y Jackknife. Del análisis de parsimonia, se obtuvieron 100 árboles con 568 pasos. Ambos análisis, Bootstrap y Jackknife, mostraron topología similar y diferencias mínimas en sus valores respaldados, mostrando que la sección *Nigri* está distribuida en dos grupos generales: uno compuesto por los clados *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. heteromorphus*; y el otro compuesto por los clados *A. aculeatus* y *A. homomorphus*, separados de las demás secciones del género *Aspergillus*.

Palabras clave: *Aspergillus* sección *Nigri*; Taxonomía; ADN ribosomal

INTRODUCTION

The three major genera of mycotoxin-producing fungi are *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. These fungi frequently contaminate foods, usually causing severe biological alterations to human and animal health (Franco, 2005; Castrillo, 2010).

Members of *Aspergillus* section *Nigri* are the most important in the genus. They are ubiquitously distributed worldwide, growing on a wide variety of substrates and being considered as responsible fungi for food spoilage (Domsch *et al.*, 1980; Pitt and Hocking, 1997; Abarca *et al.*, 2004; Geiser *et al.*, 2007). Some of them are a common source of extracellular enzymes and organic acids that are used in food processing (Yokotsuka and Sasaki, 1998; Abarca *et al.*, 2004). Moreover, *Aspergillus niger* products hold the GRAS (Generally Recognized As Safe) status from the FDA (Federal Drugs and Foods Administration, USA) (Abarca *et al.*, 2004). However, the potential capacity to produce mycotoxins by these species suppose a risk for human and animal health. Due to their biotechnological importance and because they are responsible of food spoilage, the identification of such strains needs to be unambiguous (Abarca *et al.*, 2004).

The taxonomy of black aspergilli constitutes one of the most complex and confusing in genus *Aspergillus*; therefore, several taxonomic schemes have been proposed. Classical taxonomy for classification of species is primarily based on morphological criteria, such as forms and conidial ornamentations, size of conidia, conidiophore structures, and coloration of colonies, among others (Klich, 2002). Molecular techniques have contributed to these studies and allowed significant advances in fungal taxonomic organization. Ribosomal DNA (rDNA) amplification was one of the first applications of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in mycology (White *et al.*, 1990). The rDNA unit is constituted of regions that possess highly preserved genes, as the 18S and 28S regions, and universal primers were designed to allow internal transcribed spacers amplification of any fungus, independently of genus. The amplified region comprises ITS1, 5.8S and ITS2 regions, which can have variable nucleotide sequences

(Fungaro, 2000), and are commonly used to examine phylogenetic positions or relationships at species or intraspecies level (Lee *et al.*, 2000).

For many years, several authors have discussed the composition of section *Nigri*, taking into account morphological data and using rDNA sequences for phylogenetic analyses. Raper and Fennell (1965) produced the most comprehensive monograph of the genus and all *Aspergillus* species with conidial heads in some shades of black were included in the same group. They accepted twelve species and two varieties for *Aspergillus* section *Nigri*. Al-Musallam (1980) revised the taxonomy of this group of fungi using cluster analysis involving all available morphological and cultural parameters, and established five easily distinguishable species and the *A. niger* clade. The apparently insignificant differences between the members of *A. niger* clade was the decisive reason why Al-Musallam suggested that some of the species recognized by Raper and Fennell (1965) should be reclassified as varieties. Later, Kozakiewicz (1989) made a new proposal based upon conidial ornamentations, suggested alterations in the *A. niger* clade, and distinguished 16 taxa.

The previously mentioned classifications of *Aspergillus* section *Nigri* were solely based on morphological criteria and the delimitation of some taxa is problematic because they are distinguished by relatively small differences in variable characters (Parenicova *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2003; Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2004).

New molecular approaches have shown that there is a high biodiversity in *Aspergillus* section *Nigri*, but that species are occasionally difficult to recognize based solely on their phenotypic characters (Samson *et al.*, 2007). Using this type of approaches, 19 species of *Aspergillus* section *Nigri* were accepted (Samson *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2008; Perrone *et al.*, 2008). More recently, Varga *et al.* (2011) reported that *Aspergillus* section *Nigri* includes 26 taxa.

Changes in the species concept of black aspergilli according to different authors are shown in Table 1.

As a further contribution, the aims of this paper were to study the phylogeny of *Aspergillus* section *Nigri* and their taxonomy by amplifying ITS1, 5.8S and ITS2 regions.

Raper and Fennel (1965)	Al-Musallam (1980)	Kozakiewicz (1989)	Samson <i>et al.</i> (2007); Perrone <i>et al.</i> (2008)	Varga <i>et al.</i> (2011)
<i>A. japonicus</i> Saito	<i>A. japonicus</i> var. <i>japonicus</i> Saito	<i>A. japonicus</i> Saito	<i>A. aculeatimus</i> – CBS 121060 – ITS EU159211	<i>A. acidus</i> - CBS 564.65 – ITS AJ280009 = <i>A. coreanus</i> - CBS 119384 – ITS FJ491684
<i>A. aculeatus</i> Iizuka	<i>A. japonicus</i> var. <i>aculeatus</i> Iizuka, Al-Musallam	<i>A. atroviolaceus</i> Moss.	<i>A. aculeatus</i> - CBS 172.66 – AJ279988	<i>A. aculeatimus</i> - CBS 121060 – ITS EU159211
<i>A. carbonarius</i> Bainier, Thom	<i>A. carbonarius</i> Bainier, Thom	<i>A. carbonarius</i> Bainier, Thom	<i>A. brasiliensis</i> - CBS 101740 – AJ280010	<i>A. aculeatus</i> - CBS 172.66 – ITS AJ279988
<i>A. heteromorphus</i> Batista and Maia	<i>A. heteromorphus</i> Batista and Maia	<i>A. fonsecaeus</i> Thom and Raper	<i>A. carbonarius</i> – CBS 111.26 – ITS DQ900605	<i>A. awamori</i> - CBS 557.65 – ITS AM087614
<i>A. ellipticus</i> Raper and Fennell	<i>A. ellipticus</i> Raper and Fennell, Al-Musallam	<i>A. heteromorphus</i> Batista and Maia	<i>A. costaricensis</i> – CBS 115574 – ITS DQ900602	<i>A. brasiliensis</i> - CBS 101740 – ITS AJ280010
<i>A. niger</i> van Tieghem	<i>A. helicothrix</i> Al-Musallam	<i>A. ellipticus</i> Raper and Fennell	<i>A. ellipticus</i> – CBS 707.79 – ITS AJ 280014	<i>A. carbonarius</i> - CBS 111.26 – ITS DQ900605
<i>A. ficuum</i> Reichard, Hennings	<i>A. niger</i> aggregate:	<i>A. helicothrix</i> Al-Musallam	<i>A. foetidus</i> – CBS 564.65 – ITS AJ280009	<i>A. costaricensis</i> - CBS 115574 - DQ900602
<i>A. tubingensis</i> Schöber, Mosseray	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> van Tiegh.	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> van Tiegh.	<i>A. heteromorphus</i> – CBS 117.55 – ITS AJ280013	<i>A. ellipticus</i> - CBS 707.79 – ITS AJ280014
<i>A. phoenicis</i> Corda, Thom	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> f. <i>hennebergii</i> Blochwitz, Al-Musallam	<i>A. niger</i> var. <i>tubingensis</i> Moss., Kozakiewicz	<i>A. homomorphus</i> - CBS 101889 – ITS EF166063	<i>A. eucalypticola</i> - CBS 122712 – ITS EU482439
<i>A. pulverulentus</i> McAlp, Thom	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i> Corda, Al-Musallam	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i> Corda, Al-Musallam	<i>A. ibericus</i> - CBS 121593 – ITS AY656625	<i>A. fijiensis</i> - CBS 119.49 – ITS FJ491679
<i>A. awamori</i> Nakazawa	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i> f. <i>pulverulentus</i> McAlp, Al-Musallam	<i>A. niger</i> var. <i>pulverulentus</i> McAlp, Kozakiewicz	<i>A. japonicus</i> - CBS 114.51 – ITS AJ279985	<i>A. foetidus</i> - CBS 121.28 – ITS FJ491683 = <i>A. lacticoffeatus</i> - CBS 101883 – ITS DQ900604
<i>A. foetidus</i> Naka, Thom and Raper	<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> Nakazawa, Al-Musallam	<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> Nakazawa, Al-Musallam	<i>A. lacticoffeatus</i> - CBS 101883 – ITS DQ900604	<i>A. heteromorphus</i> - CBS 117.55 – ITS AJ280013
<i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Naka, Simo and Watanabe	<i>A. niger</i> var. <i>nanus</i> Mont., Al-Musallam	<i>A. niger</i> var. <i>ficuum</i> Reich., Kozakiewicz	<i>A. niger</i> - CBS 554.65 – ITS AJ223852	<i>A. homomorphus</i> - CBS 101889 – ITS EF166063
<i>A. foetidus</i> var. <i>acidus</i> Naka, Simo and Watanabe	<i>A. niger</i> var. <i>usamii</i> Sakaguchi et al., Al-Musallam	<i>A. citricus</i> var. <i>citricus</i> Wehmer, Moss.	<i>A. piperis</i> - CBS 112811 – ITS DQ900603	<i>A. ibericus</i> - CBS 121593 – ITS AY656625
	<i>A. niger</i> var. <i>intermedius</i> Speg., Al-Musallam	<i>A. acidus</i> Kozakiewicz	<i>A. sclerotii-carbonarius</i> - CBS 121057 – ITS EU159216	<i>A. indologenus</i> - CBS 114.80 – ITS AL 280005
	<i>A. foetidus</i> Thom and Raper	<i>A. citricus</i> var. <i>pallidus</i> Naka, Simo and Watanabe, Kozakiewicz	<i>A. sclerotioniger</i> - CBS 115572 – ITS DQ900603	<i>A. japonicus</i> - CBS 114.51 – ITS AJ279985
			<i>A. tubingensis</i> - CBS 134.48 – ITS AJ223853	<i>A. neoniger</i> - CBS 115656 – ITS FJ491682
			<i>A. uvarum</i> - CBS 121591 – ITS AM745751	<i>A. niger</i> - CBS 554.65 – ITS AJ223852
			<i>A. vadensis</i> - CBS 113365 – ITS AY585549	<i>A. piperis</i> - CBS 112811 – ITS DQ900603
				<i>A. saccharolyticus</i> - CBS 127449 – ITS HM853552
				<i>A. sclerotii-carbonarius</i> - CBS 121057 – ITS EU159216
				<i>A. sclerotioniger</i> - CBS 115572 – ITS DQ900606
				<i>A. tubingensis</i> - CBS 134.48 – ITS AJ223853
				<i>A. uvarum</i> – CBS 121.595 – ITS JQ 316520
				<i>A. vadensis</i> - CBS 113365 – ITS AY585549
				<i>A. violaceofuscus</i> - CBS 123.27 – ITS FJ491678

Table 1. Species concepts of black aspergilli according to various authors.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The strains used in this study were 14 isolates belonging to *Aspergillus* section *Nigri* of three commercial yerba mate forms: five strains from milled yerba mate, without ageing (referred as YMCHA); four strains from elaborated yerba mate (referred as YMA); and 5 strains from composed yerba mate (referred as YMCA). In addition, two *Aspergillus carbonarius* OTA+ standard strains with known capacity to produce ochratoxin were included, which were provided by the University of Buenos Aires (UBA).

The section *Nigri* strains initially were classified by microbiological classic methods, using Klich (2002) codes, by taking into account main macro- and micro-morphology criteria.

Extraction of genomic DNA

The fungal strains isolated from different commercial yerba mate forms were sown in YES (Yeast Extract Sucrose) liquid medium in order to obtain large amounts of mycelium. Mycelia was filtered and washed with Tris-HCl 0.1 M (pH 8) EDTA 0.02 M (pH 8). DNA extraction was carried out with buffer solution (Tris-HCl 0.1 M pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 0.05 M pH8) at 60° C, containing Proteinase K 0.1mg/mL, β-mercaptoethanol 10mM and SDS 2 % (p/v). DNA was purified with chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v) and potassium acetate 3M, and then was precipitated with isopropyl alcohol (Fonseca, 2012).

Amplification of ribosomal DNA

Ribosomal DNA fragments (ITS1 – 5.8S – ITS2) of 14 isolates of section *Nigri* and two *A. carbonarius* OTA+ standard strains, were amplified and sequenced. For the amplification reaction primers ITS1, 5' TTCGTAGGTGAACCTGCGG, and ITS4, 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990) were used. The amplification reactions were prepared in a final volume of 20 µL, containing buffer 1X; MgCl₂ 2.5 mM; dNTP 200 µM; 10 pMol of each

primer; *Taq* DNA polymerase 0.5 U and template DNA 5 ng/µL. PCR cycling was programmed to 35 cycles after an initial denaturation of 4 min at 94° C. Each amplification cycle consisted of the following steps: denaturation (94° C, 40 s), hybridization (50° C, 40 s), and extension (72° C, 40 s). Finally, a final extension of 10 min at 72° C was realized.

Agarose gels at 1% (p/v) and 2% (p/v) were performed, containing 10 mg/mL of ethidium bromide, visualized with UV transilluminator, and finally photographed with digital camera. Gels containing 1% (p/v) agarose were used to visualize genomic DNA and those with 2 % (p/v) agarose were used to visualize PCR products.

The concentration of DNA samples was semi-quantified by comparison to the intensity of the marker.

Sequencing of the regions ITS1 – 5.8S – ITS2

Sequencing reactions of PCR products were performed by MacroGen sequencing services (Kumchun-ku, Seoul, Korea).

Bioinformatic study of the obtained sequences

The obtained sequences were compared with those deposited in Database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), with BLAST Search tool. Sequenced ITS1-5.8S-ITS2 regions and the sequences of interest retrieved from NCBI database were aligned by using the CLUSTAL W sequence editor on-line version (Thompson *et al.*, 1994). The alignments were trimmed, overhangs were removed and gaps were corrected, prior to phylogenetic calculations with BIOEDIT software (Sequence Alignment Editor), for obtaining sequences of the same size and also for comparing the same regions. The sequences were submitted to Database of the National Center for Biotechnology Information (accession numbers: JF318957, JF436881, JF436882, JF436883, JF436884, JF436885, JF436886, JF436887, JF436888, JF436889, JF436890, JF436891, JF436892, JF436893, JF436894, JF436895).

To allow an appropriate phylogenetic analyses, sequences of *Aspergillus* section *Nigri* that were

cited in Abarca *et al.* (2004) and Varga *et al.* (2011) were included in the present study (accession numbers: AJ280009, EU159211, AM087614, AJ280010, DQ900605, FJ491684, DQ900602, AJ280014, EU482439, FJ491679, FJ491683, AJ280013, EF166063, AY656625, JX291167.1, JQ316520.1, AJ279985, DQ900604, FJ491682, AJ223852, DQ900603, EU159216, HM853552, DQ900606, AJ223853, AY585549, FJ491678, L76747.1, AB000535, AF128852, AF203800, AJ000933, AY373938).

The parsimony analyses were performed with TNT version 1.1 (Willi Hennig Society Edition). Two methods were used: Bootstrap (Felsenstien, 1985) and Parsimony Jackknifing (Farris *et al.*, 1996). Both analyses included 1000 resampled matrices. The existence of local optima for data sets beyond 40–50 taxa has long been well-informed (Maddison, 1991). In all analyses, *Emericella nidulans* CBS 12135 (AJ000933) was used as an out-group.

RESULTS

Analysis of genomic DNA amplification

Nucleic acid extraction of 14 fungal isolates from different commercial yerba mate forms (previously identified as species of *Nigri* section) and two *A. carbonarius* OTA+ standard strains were analyzed.

The PCR reaction with primers ITS1 and ITS4 amplified a fragment of approximately 600 bp for each isolate. The size of the amplified product was in close agreement with the expected fragment size in *Aspergillus* species (563 to 613 bp, according to White *et al.*, 1990).

Bioinformatics study of the obtained sequences

The obtained sequences of each isolated were compared with deposited sequences in NCBI database, using BLAST as a search tool. In most cases, the high identity values obtained allowed us to assure that these species belong to *Aspergillus* section *Nigri*, always with identity values above 98 %. Seven strains of yerba mate (referred as YMCHA 73, YMCHA 71, YMCHA 55, YMA

120, YMA 119, YMA 10 and YMCA 29) were morphologically and molecularly defined as *A. niger*; three strains (referred as YMCHA 69, YMCA 18 and YMCA 2) were defined as *A. tubingensis*; and one strain (referred as YMCHA 63) was defined as *A. brasiliensis*; all strains belong to the *A. niger* clade. In addition, two standard strains (referred as PATRON I and PATRON II) were defined as *A. carbonarius*, that belongs to the *A. carbonarius* clade (Figure 1). However, three isolates of yerba mate (referred as YMCA 11, YMA 2 and YMCA 9) were morphologically defined only as *Aspergillus* section *Nigri* species, and molecularly defined as *Aspergillus* spp. (Figure 1).

Phylogenetic Analyses

Good quality sequences of approximately 600 bp were first aligned and then trimmed, and sequences 532 bp in size were obtained, prior to carrying out phylogenetic calculations.

Study of parsimony was done using Bootstrap and Jackknife analyses. Parsimony analysis resulted in 100 equally parsimonious trees 568 steps long, performing 100 RAS + TBR cycles. Our data set consisted of 134 parsimony informative characters. Both, analyses, Bootstrap and Jackknife, yielded nearly the same topology, and presented minimal differences in support values. Our trees showed that all isolated strains of yerba mate are included in the *A. niger* and *A. carbonarius* clades, except for the isolated strain referred as YMCA 11 (Figure 1).

DISCUSSION

Until a few years ago, systematic studies of microorganisms were based almost exclusively on morphological criteria (classical microbiological classification). However, the number of tools actually used in systematic studies has increased. Nowadays, both morphological and molecular criteria are taken into account (Perez Valencia *et al.*, 2005).

In this study, and for taxonomic organization of fungi, were considered the classical microbiological classification by morphological criteria and molecular techniques by amplification of ITS1,

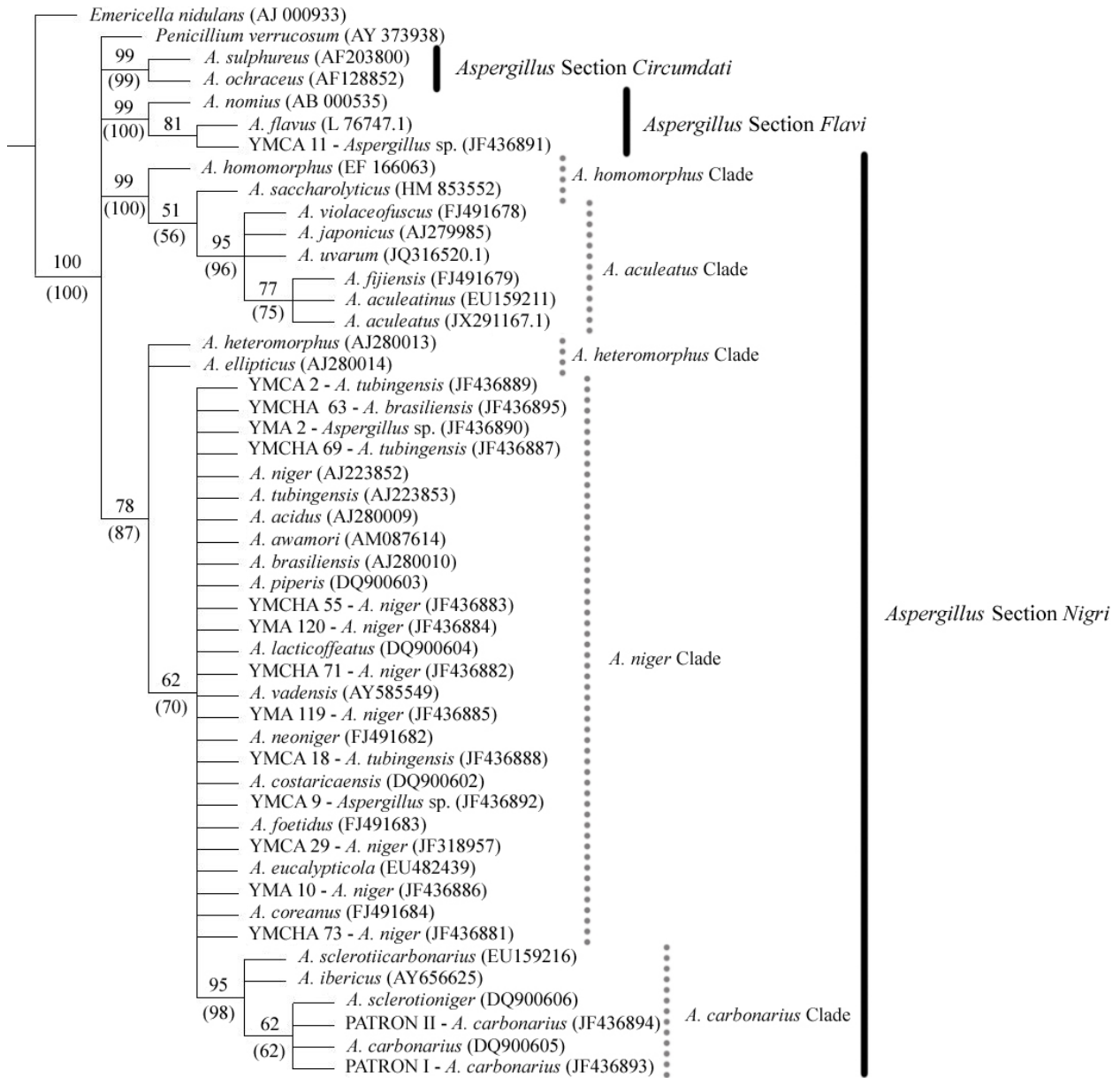


Figure 1. Phylogenetic analysis. Group support, assessed with 1000 Bootstrapping and Parsimony Jackknifing replicates. Numbers above branches correspond to Bootstrap support. Jackknife supports are given in parentheses.

5.8S and ITS2 regions. These regions are commonly used in fungi because they are composed of variable nucleotides sequences that allow the examination of phylogenetic positions or relationships at species or intraspecies level (Fungaro, 2000; Lee *et al.*, 2000).

In *Aspergillus* section *Nigri* there are very subtle differences between species, being for this reason one of the most difficult groups for classification and identification. Consequently, classical microbiological criteria are insufficient for classification (Abarca *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2011). In this study, and by applying morphological criteria, we could accurately classify the isolated strains at the species level. However, it was necessary to confirm the morphological classification with molecular information obtained by amplification of ITS1, 5.8S and ITS2 regions and by contrasting them with those in NCBI database. Classical microbiological classification and molecular data ensured the correct strain classification at the genus level.

Most of the isolated strains belonged to *Aspergillus* section *Nigri*, invariably with high identity values, except in three cases (YMCA 11, YMA 2 y YMCA 9) which could only be morphologically defined as *Aspergillus* section *Nigri* and molecularly defined as *Aspergillus* spp., reflecting the confusing and complex taxonomy of this section. These exceptional cases either may belong to the *A. niger* aggregate or the bioinformatics analysis using solely the ITS conserved regions was insufficient for the correct molecular identification of *Aspergillus* section *Nigri*. Some authors have cited other conserved regions as useful for molecular classification, such as the calmodulin or parts of β -tubulin sequences (Peterson, 2000; Abarca *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2011).

With respect to the phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Nigri*, in previous studies with amplification of ITS regions, Parenicova *et al.* (2000) reported that *A. carbonarius* could be easily distinguished from other black aspergilli. They cited that *A. carbonarius* forms a separate clade within the biseriata black aspergilli. Then, Parenicova *et al.* (2001) reported that ITS sequences could be used to distinguish uniseriate aspergilli in a separate clade from a general clade containing biseriata species and species belonging to section *Flavi* and *Circumdati*; but could not be used for differentiation

within uniseriate species.

In this study, were observed four different general clades of *Aspergillus* strains, section *Flavi*, section *Circumdati*, and two general clusters of section *Nigri*: one general cluster containing *A. aculeatus* and *A. homomorphus* clades; and the other general cluster with *A. heteromorphus* clade and *A. niger* clade which includes *A. carbonarius* clade. *A. carbonarius* formed a separate branch into *A. niger* clade (biseriata species), as reported by Parenicova *et al.* (2000). But then, it was observed that in *Aspergillus* section *Nigri*, both biseriata (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus* and *A. homomorphus* clades) and uniseriate species (*A. aculeatus* clade) formed two general clades separated from section *Flavi* clade and section *Circumdati* clade (Figure 1). It was not observed that the uniseriate species formed a separate clade from all others, as previously cited by Parenicova *et al.* (2000).

Based on phylogenetic analysis of ITS sequence data, Varga *et al.* (2011) reported that *Aspergillus* section *Nigri* formed two general clusters: one cluster containing *A. aculeatus* and *A. homomorphus* clades and the other cluster containing *A. heteromorphus* clade and *A. niger* clade with *A. carbonarius* clade, as observed in this study.

In this phylogenetic analysis it is possible to visualize that some of the isolated strains of yerba mate belong to *A. niger* clade so it can be argued that YMA 2 and YMCA 9 strains, which were morphologically defined as *Aspergillus* section *Nigri* and molecularly defined as *Aspergillus* spp., also belong to section *Nigri* clade. Likewise, it was observed that YMCA 11 strain belongs to section *Flavi*; it was molecularly referred as *A. flavus*, being the only strain that was poorly characterized by classical microbiological methods (Figure 1).

In addition, parsimony analyses performed with Bootstrap and Jackknife methods, revealing minimal differences between the values obtained with both methods; this allows us to assure that the phylogenetic analyses performed were consistent and also they were in accordance with other current reports (Varga *et al.*, 2011).

Moreover, in this study, and in order to observe whether toxin production had implications for phylogeny, were considered sequences of known species with OTA capability, as *Penicillium*

verrucosum, *Aspergillus ochraceus* and patterns I and II strains. The results did not show that these species were part of the same clade, the ochratoxin A production does not seem to have implications on the phylogeny of ochratoxin A-producing species when ITS sequences were considered (Figure 1). Some authors reported that a chloroperoxidase gene presumably takes part in ochratoxin biosynthesis in *P. verrucosum*, so the use of this sequence on phylogenetic analysis can be useful for discriminate the ochratoxin A-producing species from others (Geiser *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2011).

Our results show that *Aspergillus* section *Nigri* has a polyphyletic origin and that it is composed of two general clusters, one containing *A. aculeatus* and *A. homomorphus* clades and the other containing *A. heteromorphus* clade and *A. niger* clade which includes *A. carbonarius* clade. Also, the uniseriate species (*A. aculeatus* clade) did not appear as a different group in relation to the biseriate species in *Aspergillus* genus phylogeny. We can also conclude that the taxonomic classification of *Aspergillus* section *Nigri* still remains as confusing and complex topic, and to date, it is necessary to take several precautions for studying the phylogeny of *Aspergillus* section *Nigri*.

LITERATURE CITED

- Abarca M.L., Accensi F., Cano J., Cabañes F.J. (2004) Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. Anton van Leeuwenhoek Inter. J. Gen. and Molec. Microbiol. 86: 33-49.
- Al-Musallam A. (1980) Revision of the black *Aspergillus* species. Thesis. University of Utrecht, The Netherlands.
- Castrillo M.L. (2010) Caracterización morfológica y confirmación molecular de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Tesis de Grado. Fac. Cs. Exactas, Qcas. y Naturales, UNAM. Misiones, Argentina.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. (1980) Compendium of soil fungi. Acad. Press, London, UK.
- Farris J.S., Albert V.A., Källersjö M., Lipscomb D., Kluge A.G. (1996) Parsimony Jackknifing outperforms Neighbor-Joining. Cladistics 12: 99-124.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies, an approach using the Bootstrap. Evolution 38: 16-24.
- Fonseca M.I. (2012) Utilización de hongos de pudrición blanca de la provincia de Misiones en procesos de biopulrado: Aspectos bioquímicos y moleculares de sistemas ligninolíticos involucrados y prospección biotecnológica. Tesis Doctoral, Fac. Bqca, Qca y Fcia, UNT. Tucumán, Argentina.
- Franco E. (2005) *Aspergillus* sección *Nigri*, estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas. Tesis Doctoral, Fac. Veterinaria, UAB. Barcelona, España.
- Fungaro M.H.P. (2000) PCR na Micologia. Biotecnol. Ciênc. e Desenvol. 17: 12-16.
- Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J., Samsom R.A. (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Study Mycol. 59: 1-10.
- Klich M.A. (2002) Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Kozakiewicz Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers 161: 1-188.
- Lee J.S., Ko K.S., Jung H.S. (2000) Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. FEMS Microbiology Letters 187: 89-93.
- Maddison D. (1991) The discovery and importance of multiple islands of most parsimonious trees. Syst. Zool. 40: 315-328.
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. (2008). Two new species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee

- beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1727-1734.
- Parenicova L., Kester H.C., Benen J.A., Visser J. (2000) Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Lett.* 2-3: 333-336.
- Parenicova L., Skouboe P., Frisvad J., Samson R.A., Rossen L., ten Hoor-Suykerbuyk M., Visser J. (2001) Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 521-527.
- Pérez Valencia L.I., Santerre A., Villalobos Arámbula A.R., Galván Corona A., Torres-Torres M.G., Rodríguez Contreras A., Guzmán Dávalos L. (2005) Extracción de DNA y amplificación de secuencias del ITS del DNAR de *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes) para su uso en el análisis filogenético. *CUCBA.* 8 pp.
- Perrone G., Varga J., Susca A., Frisvad J.C., Stea G. (2008) *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1032-1039.
- Peterson S.T. (2000) Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson R.A., Pitt J.I. (Eds) *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification.* Harw. Acad. Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 323-355.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage.* Ed. Blackie Acad. and Profess. London. UK.
- Raper K.B., Fennell D.I. (1965) *The genus Aspergillus.* Willians and Wilkins, Baltimore.
- Samson R.A., Houbraken J., Kuijpers A., Mick F.J., Frisvad J. (2004) New ochratoxin A or sclerotium species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies Mycol.* 50: 46-61.
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. (2007) Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology* 59: 129-146.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.* 22: 4673-4680.
- Varga J., Rigó K., Tóth B., Téren J., Kozakiewicz Z. (2003) Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important micotoxins. *Food Technol. Biotechnol.* 41: 29-36.
- Varga J., Frisvad J.C., Kocsubé S., Brankovics B., Tóth B., Szigeti G., Samson R.A. (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies Mycol.* 69: 1-17.
- White T.J., Burns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* Acad Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yokotsuka T., Sasaki M. (1998) Fermented protein foods in the Orient: shoyu and miso in Japan. In: Wood B.J.B. (Ed.) *Microbiology of fermented foods.* Blackie Acad. and Profess, London.

POLIMORFISMO EN LOS GENES ESTEAROIL-COENZIMA A DESATURASA Y ACIL-COA: DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASA 1 EN EL GANADO SIBONEY DE CUBA

Acosta A.^{1*}, Uffo O.¹, Ronda R.¹, Fernandes Z.², Lopes F.³,
Gomes-Filho M.A.², Barbosa S.B.P.³

¹ Laboratorio de Genética Molecular (GenMol), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CEN-SA) PO Box 10, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

² Laboratório Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), CEP 55292-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), Departamento de Zootecnia, UFRPE, CEP 55292-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

* acabad80@gmail.com

ABSTRACT

Milk fat composition is one of the factors influencing the nutritional quality of dairy products. We studied the A293V polymorphisms in the Stearoyl-Coenzyme A Desaturase locus (SCD) and the K232A polymorphisms in the Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 1 locus (DGAT1). Both enzymes have an important role in lipid metabolism. The aims of the present study was to determine gene frequencies for both *loci* in the breed Siboney de Cuba (N=165). The methodology for both *loci* was amplification created restriction sites (ACRS). We observed that the SCD^A allele and the DGAT1^A allele were the most frequent in the studied population. Three genotypes were identified at each *locus*, with the following frequencies: 0.821, 0.172 and 0.007 for genotypes AA, AS and SS, respectively, at the SCD *locus* and 0.686, 0.212 and 0.102 for genotypes AA, AK and KK, respectively, at the DGAT1 *locus*. The SCD *locus* was in Hardy-Weinberg equilibrium, whereas a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0,001$) was found at the DGAT1 *locus*.

Key words: cattle, SCD, DGAT1, allele frequency

RESUMEN

La composición de ácidos grasos en la leche es de gran importancia para evaluar la calidad nutricional de los productos lácteos. Se estudiaron los polimorfismos A293V del *locus* estearoil-coenzima A desaturasa (SCD) y K232A del *locus* Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1). Ambas enzimas tienen una importante función en el metabolismo lipídico. El objetivo fue determinar las frecuencias génicas en la raza Siboney de Cuba (N=165). La metodología empleada para ambos *loci* fue la amplificación creando el sitio de restricción (ACRS). Se observó que los alelos SCD^A y DGAT1^A fueron los más frecuentes en la población estudiada. Se identificaron los tres genotipos en ambos *loci*, con frecuencias en el *locus* SCD de 0,821; 0,172 y 0,007 para los genotipos AA, AS y SS respectivamente, mientras que las frecuencias de los genotipos AA, AK y KK fueron de 0,686; 0,212 y 0,102 en el *locus* DGAT1. El *locus* SCD se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, no siendo así para el *locus* DGAT1 ($p < 0,001$).

Palabras clave: bovino, SCD, DGAT1, frecuencia alélica.

INTRODUCCIÓN

Es creciente el interés en la composición de ácidos grasos en la leche como parámetro de gran importancia para evaluar la calidad nutricional de la misma (Morris *et al.*, 2007; Schennink *et al.*, 2008; Schennink *et al.*, 2009a; Schennink *et al.* 2009b). Se conoce que la concentración de ácidos grasos en la leche está influenciada en gran medida por la alimentación que reciben los animales (Jenkins y McGuire, 2006), pero la bibliografía sugiere que el estudio de genes candidatos asociados a este carácter pudiese contribuir a obtener producciones lácteas de mayor valor nutricional (Schennink *et al.*, 2008; Signorelli *et al.*, 2009; Conte *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

En diferentes investigaciones se propone el estudio como genes candidatos a estearoil-coenzima A desaturasa (*Stearoyl-Coenzyme A Desaturase* SCD) y a Acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa 1 (*Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 1* DGAT1) (Mele *et al.*, 2007; Näslund *et al.*, 2008; Schennink *et al.*, 2008; Maharani *et al.*, 2012). En el *locus* SCD se describe un polimorfismo de nucleótido simple (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) en el exón 5 que causa la sustitución del aminoácido alanina (alelo A) por valina (alelo V) en la posición 293 de la cadena aminoácídica (Taniguchi *et al.*, 2004). Se ha descrito una relación significativa entre el polimorfismo A293V del *locus* SCD con producción de leche, contenido de grasa y la composición de la fracción lipídica de la leche (Mele *et al.*, 2007; Macciotta *et al.*, 2008; Kgwatalala *et al.*, 2009a Mao *et al.*, 2012). En el *locus* DGAT1 la sustitución aminoácídica de lisina (alelo K) por alanina (alelo A) en la posición 232 se asocia a variaciones en la composición de ácidos grasos en la leche (Kaupe *et al.*, 2007; Schennink *et al.*, 2007), así como al contenido de grasa y proteína en la misma (Signorelli *et al.*, 2009).

Siboney de Cuba es una raza sintética obtenida a partir del cruzamiento $\frac{5}{8}$ Holstein - $\frac{3}{8}$ Cebú Cubano, la cual juega un papel preponderante en la producción láctea en el país. El objetivo del presente trabajo fue determinar las frecuencias génicas de los polimorfismos A293V del *locus* SCD y K232A del *locus* DGAT1 en la raza Siboney de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y obtención del material genético

Cumpliendo las normas establecidas del comité de ética y bienestar animal, se tomaron muestras de sangre periférica de 165 vacas de la raza Siboney de Cuba. Se emplearon 0.5 ml de 0.5 M EDTA como anticoagulante y se procedió a la extracción y purificación del ADN mediante el método de precipitación salina descrito por Miller *et al.* (1988).

Genotipado de los loci SCD y DGAT1

Los polimorfismos de interés en estos dos *loci*, fueron estudiados a partir del desarrollo de la metodología de ACRS combinada con el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en ambos casos. Los oligonucleótidos empleados en la PCR fueron diseñados con el empleo del programa Vector NTI Advance™ 11.0 (Invitrogen Corporation 2008) (Tabla 1). El volumen final de la reacción fue de 25 μ L constituida por buffer de reacción 10X (conteniendo 10mM TrisHCl, pH 9; 50mM KCl y 0,1 % Triton X-100), 50mM MgCl₂, 1,25mM dNTPs, 20nmol/ μ L de oligonucleótido correspondiente y 5U/ μ L de polimerasa ADN comercial (Fermentas), completándose el volumen final con agua. Los programas de amplificación empleados para ambos *loci* fueron similares, variando sólo en la temperatura de alineamiento. Dichos programas constaron de 94°C por 5min en la etapa de desnaturalización, seguido por 32 ciclos de 94°C por 1min, 1min de alineamiento y 72°C por 1min; el tiempo final de extensión fue de 5min a 72°C.

A partir de 10 μ L del producto amplificado se procedió a la digestión con las enzimas específicas para cada uno de los fragmentos (Tabla 1). La temperatura de incubación fue de 37°C durante 3 hs. La visualización del producto digerido se realizó en gel de agarosa al 2%, TBE 0,5X, con tinción de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnología), empleando 0,3 μ L por cada 5 μ L de producto digerido.

Procesamiento estadístico

El programa GENEPOP versión 3,4 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008) se empleó para realizar el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, y la prueba exacta de la desviación de los *loci* del estado de equilibrio Hardy-Weinberg. El cálculo de la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) por *locus* se realizó usando el programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

RESULTADOS

A partir de los oligonucleótidos diseñados se obtuvieron fragmentos amplificados de 257pb para el *locus* SCD y de 210pb para el *locus* DGAT1. El empleo de la metodología de creación de sitio de restricción permitió visualizar los tres genotipos para ambos *loci* (Figuras 1 y 2).

Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada *locus* se muestran en la Tabla 2. En el *locus* SCD el alelo más frecuente fue SCD^A, siendo la heterocigosidad observada mayor que la esperada, y se comprobó que este *locus* se muestra en estado de equilibrio Hardy-Weinberg. El *locus* DGAT1 presentó el alelo DGAT1^A más frecuentemente, observándose una desviación del estado de equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0,001$), con una disminución de la heterocigosidad observada con respecto a la esperada.

DISCUSIÓN

El comportamiento de las frecuencias alélicas del *locus* SCD en la raza Siboney de Cuba es similar a lo descrito en otras investigaciones, con predominio del alelo SCD^A. En el caso de estudios en animales de la raza Holstein la frecuencia del alelo SCD^A se encuentra entre 0,57 y 0,796 (Mele *et al.*, 2007; Komisarek y Dorynek, 2009; Signorelli *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2012). Razas como la Jersey presentan valores de la frecuencia de SCD^A superiores a los antes mencionados, en el rango de 0,808 a 0,94 (Moioli *et al.*, 2007; Demeter *et al.*, 2009; Kgwatalala *et al.*, 2009b; Signorelli *et al.*, 2009). La mayor parte de las otras razas estudiadas presentan mayor frecuencia del alelo SCD^A (Taniguchi *et al.*, 2004; Schennink *et al.*, 2008; Matsushashi *et al.*, 2010). Se describen las

poblaciones de ganado Carmelita Italiano (Conte *et al.*, 2010) y ganado coreano Hanwoo (Maharani *et al.*, 2012) con valores en la frecuencia del alelo SCD^A inferior a 0,5.

La heterocigosidad observada en la raza Siboney fue ligeramente superior a la esperada en el *locus* SCD y tras la prueba exacta de equilibrio Hardy-Weinberg se observó que mantenía la condición de equilibrio. En la mayoría de los estudios consultados, el *locus* SCD se mantiene bajo la condición de equilibrio Hardy-Weinberg (Schennink *et al.*, 2008; Demeter *et al.*, 2009; Conte *et al.*, 2010; Maharani *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2012). Por otra parte, las poblaciones de ganado Negro Japonés (Taniguchi *et al.*, 2004) y Holstein Friesian Italiano (Mele *et al.*, 2007) se describen como fuera de esta condición de equilibrio, observándose en ambos casos un exceso de heterocigotos.

En el *locus* DGAT1, el alelo con mayor frecuencia es el DGAT1^A, lo cual era de esperar debido a la alta proporción de Holstein ($5/8$) por la que está formada la raza Siboney. El Girolando brasileño, que es otra raza híbrida, mostró a DGAT1^A como el alelo de mayor frecuencia (Cardoso *et al.*, 2011). En tal sentido los estudios realizados por Winter *et al.* (2002) y Lacorte *et al.* (2006) muestran que en las razas de *Bos taurus* el alelo DGAT1^A tiene las mayores frecuencias. Igualmente en los estudios de Kaupe *et al.* (2004), en los que se evaluó el polimorfismo K232A en 38 razas, se observó que en 31 de ellas la frecuencia del alelo DGAT1^A es superior a 0,5; en las siete razas restantes en las que predomina el alelo DGAT1^K se agrupan las tres poblaciones de *Bos indicus* y cuatro de las poblaciones con alto contenido de grasa en la leche, a partir de la clasificación realizada por Jensen (1995). Los estudios realizados en Holstein Friesian Alemán (Schennink *et al.*, 2008; Demeter *et al.*, 2009), ganado Carmelita Italiano (Conte *et al.*, 2010), Holstein Chino (Mao *et al.*, 2012), las tres razas estudiadas por Gautier *et al.* (2007) y las dos estudiadas por Näslund *et al.* (2008) mostraron que el alelo DGAT1^A tiene frecuencia predominante. En cambio, dos de las tres poblaciones de ganado neozelandés estudiadas por Spelman *et al.* (2002) y el Holstein Alemán (Kaupe *et al.*, 2007) mostraron a DGAT1^K como el alelo predominante.

Se aprecia una desviación del estado de equilibrio Hardy-Weinberg en la raza Siboney de

Cuba ($p < 0,001$) debido a un aumento del genotipo DGAT1^{AA}, lo que evidencia una disminución considerable de la heterocigocidad observada con respecto a la esperada. La condición de desequilibrio en el *locus* DGAT1 fue descrita en dos de las seis poblaciones estudiadas por Lacorte *et al.* (2006), mientras que en razas como el Holstein Friesian

Alemán (Schennink *et al.*, 2008; Demeter *et al.*, 2009), el ganado Carmelita Italiano (Conte *et al.*, 2010), el Girolando (Cardoso *et al.*, 2011) y el Holstein Chino (Mao *et al.*, 2012) se observa este *locus* bajo la condición de equilibrio Hardy-Weinberg.

Locus	Nombre	Oligonucleótidos (5'-3')	Fragmento Amplificado	Ta (°C) ^a	Enzima	Buffer Específico
SCD	SCD_F	ATTCTGGTTCCCTGGGAGCAG	257pb	54	BtsI	NEBufer 4
	SCD_R	GGCTTGCTCTTAAACCTGGAAT				
DGAT1	DGAT1_F	GCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTCAG	210pb	61	Hpy188I	NEBufer 4
	DGAT1_R	GGGGAAGTTGAGCTCGTAGCACAGGG				

Tabla 1. Oligonucleótidos y enzimas de restricción empleadas en la amplificación de los fragmentos SCD y DGAT1.

^aTemperatura de alineamiento.

Locus	Alelos	Genotipos	H _o	H _e	P-valor
SCD	A	AA	0.821	0.172	1.000
	V	AV	0.172		
	VV	0.007			
DGAT1	A	AA	0.686	0.212	0.331
	K	AK	0.212		
	KK	0.102			

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) y prueba exacta de equilibrio Hardy-Weinberg.

*** $p < 0.001$

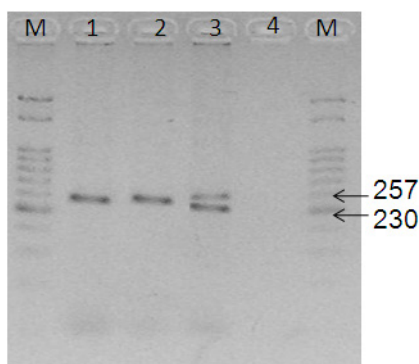


Figura 1. Amplificación y digestión de SCD, Línea M: MPM 50pb, Línea 1: producto amplificado, Línea 2: genotipos AA, Línea 3: genotipos AV, Línea 4: genotipos VV, Línea 5: control negativo.

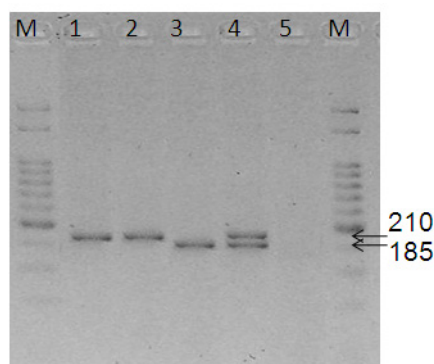


Figura 2. Amplificación y digestión de DGAT1 Línea M: MPM 50pb, Línea 1: producto amplificado, Línea 2: genotipos AA, Línea 3: genotipos KK, Línea 4: genotipos AK, Línea 5: control negativo.

CONCLUSIONES

Se identificaron las dos variantes alélicas en los *loci* estudiados. Los alelos SCD^A y DGAT1^A fueron los de mayor frecuencia en la población Siboney de Cuba. Se observó que el *locus* SCD se encuentra bajo la condición de equilibrio Hardy-Weinberg, no siendo así la condición para el *locus* DGAT1 ($p < 0,001$).

BIBLIOGRAFÍA

- Cardoso S.R., Queiroz L.B., Goulart V.A., Mourão G.B., Benedetti E., Goulart L.R. (2011) Productive performance of the dairy cattle Girolando breed mediated by the fat-related genes DGAT1 and LEP and their polymorphisms. *Research in Veterinary Science* 91: 107-112.
- Conte G., Mele M., Chessa S., Castiglioni B., Serra A., Pagnacco G., Secchiari P. (2010) Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Science* 93: 753-763.
- Demeter R.M., Schopen G.C.B., Oude Lansink A.G.J.M., Meuwissen M.P.M., Van Arendonk J.A.M. (2009) Effects of milk fat composition, DGAT1, and SCD1 on fertility traits in Dutch Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 92: 5720-5729.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Gautier M., Capitan A., Fritz S., Eggen A., Boichard D., Druet T. (2007) Characterization of the DGAT1 K232A and Variable Number of Tandem Repeat Polymorphisms in French Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 2980-2988.
- Jenkins T.C., McGuire M.A. (2006) Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal Dairy Science* 89: 1302-1310.
- Jensen R.G. (1995) *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, San Diego, USA.
- Kaupe B., Brandt H., Prinzenberg E., Erhardt G. (2007) Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science* 85: 11-21.
- Kaupe B., Winter A., Fries R., Erhardt G. (2004) DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos*

- taurus cattle breeds. *Journal of Dairy Research* 71: 182-187.
- Kgwatalala P.M., Ibeagha-Awemu E.M., Mustafa A.F., Zhao X. (2009a) Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics* 40: 609-615.
- Kgwatalala P.M., Ibeagha-Awemu E.M., Mustafa A.F., Zhao X. (2009b) Influence of stearyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 92: 1220-1228.
- Komisarek J., Dorynek Z. (2009) Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics* 50: 125-132.
- Lacorte G., Machado M., Martinez M., Campos A., Maciel R., Verneque R., Teodoro R., Peixoto M., Carvalho M., Fonseca C. (2006) DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genet. Mol. Res.* 5: 475-482.
- Macciotta N.P.P., Mele M., Conte G., Serra A., Cassandro M., Dal Zotto R., Cappio Borlino A., Pagnacco G., Secchiari P. (2008) Association Between a Polymorphism at the Stearoyl CoA Desaturase Locus and Milk Production Traits in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 91: 3184-3189.
- Maharani D., Jung Y., Jung W., Jo C., Ryoo S., Lee S., Yeon S., Lee J. (2012) Association of five candidate genes with fatty acid composition in Korean cattle. *Molecular Biology Reports*. doi:10.1007/s11033-011-1426-6
- Mao Y.J., Chen R.J., Chang L.L., Chen Y., Ji D.J., Wu X.X., Shi X.K., Wu H.T., Zhang M.R., Yang Z.P., König S., Yang L.G. (2012) Effects of SCD1- and DGAT1-genes on production traits of Chinese Holstein cows located in the Delta Region of Yangtze River. *Livestock Science*. doi:10.1016/j.livsci.2011.12.019
- Matsushashi T., Maruyama S., Uemoto Y., Kobayashi N., Mannen H., Abe T., Sakaguchi S., Kobayashi E. (2010) Effects of FASN, SCD, SREBP1 and GH gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*. doi: 10.2527/jas.2010-3121
- Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Macciotta N.P.P., Serra A., Buccioni A., Pagnacco G., Secchiari P. (2007) Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 90: 4458-4465.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 16: 12-15.
- Moioli B., Contarini G., Avalli A., Catillo G., Orrù L., De Matteis G., Masoero G., Napolitano F. (2007) Short Communication: Effect of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Polymorphism on Fatty Acid Composition of Milk. *Journal of Dairy Science* 90: 3553-3558.
- Morris C.A., Cullen N.G., Glass B.C., Hyndman D.L., Manley T.R., Hickey S.M., McEwan J.C., Pitchford W.S., Bottema C.D.K., Lee M.A.H. (2007) Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome* 18: 64-74.
- Näslund J., Fikse W.F., Pielberg G.R., Lundén A. (2008) Frequency and Effect of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 91: 2127-2134.
- Raymond M., Rousset F. (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.

- Schennink A., Bovenhuis H., Léon-Kloosterziel K.M., Van Arendonk J.A.M., Visker M.H.P.W. (2009a) Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics* 40: 909-916.
- Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Van der Poel J.J., Bovenhuis H., Van Arendonk J.A.M. (2009b) *Short communication*: Genome-wide scan for bovine milk-fat composition. II. Quantitative trait loci for long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 92: 4676-4682.
- Schennink A., Heck J., Bovenhuis H., Visker M., Van Valenberg H., Van Arendonk J. (2008) Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *Journal of Dairy Science* 91: 2135-2143.
- Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Heck J.M.L., Bovenhuis H., Van Der Poel J.J., Van Valenberg H.J.F., Van Arendonk J.A.M. (2007) DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics* 38: 467-473.
- Signorelli F., Orrù L., Napolitano F., De Matteis G., Scatà M.C., Catillo G., Marchitelli C., Moioli B. (2009) Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds. *Livestock Science* 125: 74-79.
- Spelman R.J., Ford C.A., McElhinney P., Gregory G.C., Snell R.G. (2002) Characterization of the DGAT1 Gene in the New Zealand Dairy Population. *Journal of Dairy Science* 85: 3514-3517.
- Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S. (2004) Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* 14: 142-148.
- Wang X., Chen R., Yang Z., Mao Y., Ji D., Chen Y., Chang L., Li Y., Li R. (2011) Genetic Polymorphism of the SCD1 Gene and Its Associations with Milking Traits in Chinese Holstein. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*. doi: CNKI:SUN:XMSY.0.2011-07-019
- Winter A., Krämer W., Werner F.A.O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J.E., Thaller G., Fries R. (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9300-9305.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer el soporte financiero brindado por el proyecto CAPES-MES 085-09, Brasil-Cuba para la realización de esta investigación. También agradecemos las facilidades brindadas por la Dirección Nacional de Genética y la Empresa Valle de Perú para la obtención de muestras del rebaño Siboney de Cuba.



LA APTITUD COMBINATORIA ESPECÍFICA EN EL MAÍZ (*Zea mays* L. ssp. *mays*) PARA DOBLE PROPÓSITO EN RÍO CUARTO, CÓRDOBA, ARGENTINA.

Di Santo H.¹, Castillo E.¹, Ferreira A.¹, Grassi E.¹, Ferreira V.¹

¹Genética, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.

egrassi@ayv.unrc.edu.ar

ABSTRACT

The dual purpose maize is useful in mixed farming establishments because they are suitable to the purposes of grain crop and direct or deferred feed for livestock. A breeding plan to improve land maize populations for forage use is carried out at the National University of Río Cuarto. The aim of this work was to determine the Specific Combining Ability of inbred lines through the productive performance of their single-cross hybrids. A diallel cross was performed, and eighteen traits of the single cross hybrids were studied during three years. A completely randomized block design with three replicates was used, and ANOVA for data analysis was carried out. Specific combining ability trials showed significant positive values for most traits. This allowed identifying and classifying single-cross hybrids according to their potential usability. Seven single-cross hybrids were chosen: one for dual purpose aptitude, three for grain yield or high deferred forage production and three for silage in milk-dough grain stage. It is considered necessary to confirm the performance and productivity of promising single-cross hybrids varying regional environments and agronomic conditions set against commercial simple cross hybrids to verify the production potential and stability.

Key words: maize, inbred lines, single cross-hybrids, agronomic uses.

RESUMEN

Los maíces doble propósito son útiles en los establecimientos de producción mixta ya que se adaptan a los propósitos de cosecha de grano y alimento directo o diferido para el ganado. En la Universidad Nacional de Río Cuarto se ejecuta un proyecto de mejoramiento de maíz forrajero a partir de poblaciones locales. El objetivo fue determinar la aptitud combinatoria específica (ACE) de líneas endocriadas. Se realizó el cruzamiento dialélico y durante tres campañas se analizó la ACE de las líneas a través de sus híbridos, empleando 18 caracteres; el diseño fue en bloques completos al azar con tres repeticiones y los datos se analizaron mediante ANOVA. Los ensayos de ACE mostraron valores positivos y significativos para la mayoría de los caracteres evaluados. Esto permitió identificar y clasificar los híbridos simples según su potencial aptitud de uso. Del total de híbridos simples se eligieron siete, uno por su aptitud para doble propósito, tres por su alta producción de forraje diferido o grano y tres para ensilado en estado lechoso-pastoso. Se considera necesario confirmar el comportamiento y productividad de los híbridos simples promisorios variando ambientes regionales y condiciones agronómicas contrastándolos con testigos comerciales a fin de verificar el potencial de producción así como su estabilidad.

Palabras clave: maíz, líneas endocriadas, híbridos simples, usos agronómicos.

INTRODUCCIÓN

El maíz, *Zea mays* L. ssp. *mays* (Iltis y Doebley, 1980), es uno de los cultivos más antiguos, ocupa el segundo lugar a nivel mundial en volumen de producción y tiene gran importancia socio-económica ya sea para alimento humano o animal o como fuente de un gran número de productos industriales (Watson, 1988; Fussell, 1999).

La planta de maíz es un excelente forraje para el ganado bovino de carne y de leche. Se utiliza como forraje en varias etapas del crecimiento, desde estado juvenil de pasto hasta la emisión de la panoja o más adelante. Para obtener la máxima producción de Materia Seca (MS) digestible por hectárea con la máxima energía (forraje energético), el estado de grano lechoso-pastoso es el más adecuado y supera a cualquier otro cultivo anual. En ese estado es el cultivo ideal para ensilar (Gallais *et al.*, 1976; Paliwal *et al.*, 2001).

El cultivo está ampliamente difundido en los establecimientos de producción mixta de la región subhúmeda-semiárida argentina. En la alimentación animal se emplea como grano, forraje verde, silaje en estado de grano lechoso-pastoso y pastoreo en pie cuando se prevé mala cosecha de grano o del rastrojo. La obtención de materiales con diferentes aptitudes de utilización para los sistemas mixtos regionales debería combinar la producción de grano con caracteres de gramíneas forrajeras, tales como alta cantidad de materia seca total, tolerancia a sequía, macollamiento, rebrote y plasticidad (Reynoso, 1996). La definición más simple para un maíz doble propósito es el que considera la producción de grano y como alternativa el pastoreo en estado vegetativo y reproductivo temprano, el picado y el pastoreo del cultivo diferido.

La superficie sembrada en la Argentina fue de aproximadamente $4,56 \times 10^6$ has en la campaña 2010/11, mientras que en la región subhúmeda-semiárida fue de $1,657 \times 10^6$ has, de las cuales, 68,9 % correspondieron a la provincia de Córdoba, 8,4 % a San Luis y 22,6 % a La Pampa. La región mencionada aportó el 29,7 % de la producción nacional (SIIA, 2012). Los registros históricos indican que el 90 % del maíz se cosecha como grano para consumo humano o animal y el resto se destina a silaje o consumo directo o diferido por el ganado; este último destino ocupa alrededor de 468.000 has

en la región subhúmeda-semiárida (INDEC, 2005). Sin embargo, en las últimas dos campañas se estima una superficie de maíz picado para silaje de entre 750.000 y 850.000 has (CACF, 2012; Maizar, 2012).

En 1908, G.H. Shull fue el primero que sugirió la utilización de los híbridos F_1 producto de la cruce entre líneas endocriadas (en Crow, 1998). Sprague y Tatum (1942) definieron los términos aptitud combinatoria general (ACG) y aptitud combinatoria específica (ACE) en relación al comportamiento relativo de las líneas al ser cruzadas, donde ACG designa el comportamiento promedio de una línea en combinaciones híbridas, y ACE designa la desviación de cada combinación con respecto a la ACG de los progenitores (Hallauer y Miranda Filho, 1988; Quemé de León *et al.*, 1991).

El conocimiento de la aptitud combinatoria de los progenitores permite seleccionar aquellos de buen comportamiento en una serie de cruzamientos e identificar combinaciones específicas de comportamiento superior (Gutiérrez del Río *et al.*, 2004; Castañón-Nájera *et al.*, 2005; De la Cruz-Lázaro *et al.*, 2010). Una vez que se han seleccionado las líneas endocriadas teóricamente mejores basándose en su buena aptitud combinatoria general, es necesario identificar los cruzamientos simples, de tres vías o dobles que producirán los mayores rendimientos (Sprague y Tatum, 1942; Allard, 1978). El desarrollo de cultivares híbridos simples requiere analizar los resultados de los cruzamientos dialélicos (Russel, 1973; Allard, 1978; Hallauer y Miranda Filho, 1988).

La Argentina posee como antecedentes la creación de una variedad de maíz doble propósito y macolladora en la EEA Bordenave, donde se obtuvo el cultivar "Don Faustino INTA" (Gorostegui, 1971) y se realizaron varios trabajos con distinto germoplasma de maíz y sus parientes silvestres en el Instituto Fitotécnico Santa Catalina de la UN de La Plata, EEA Pergamino-INTA, UN de La Pampa, UN de Lomas de Zamora (Magoja y Pischedda, 1988; Troiani *et al.*, 1988; Paccapelo y Molas, 1996; Torrecillas y Bertoia, 2000).

A partir de un proyecto destinado al mejoramiento de maíz para uso forrajero iniciado con tres poblaciones locales macolladoras, en la UN Río Cuarto se efectuaron seis ciclos de selección recurrente de medios hermanos (Lonnquist, 1964),

obteniendo el Grado de Determinación Genética y los coeficientes de variación genética de líneas S_1 y S_2 (Grassi *et al.*, 2006). En base a una prueba *top cross* se evaluó la ACG y se eligieron cinco líneas para la formación de híbridos simples y estudiar su validación agronómica (Grassi *et al.*, 2009; Grassi, 2009).

El objetivo propuesto en este trabajo fue determinar la aptitud combinatoria específica de líneas endocriadas de maíz, seleccionadas por su aptitud combinatoria general, a través de los híbridos simples obtenidos a partir del cruzamiento dialélico, identificando los más aptos para doble propósito en base a caracteres morfofisiológicos y de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de aptitud combinatoria específica (ACE) se realizaron en el Campo de Docencia y Experimentación de la UN de Río Cuarto (33° 06' 22" S; 64° 17' 52" O) ubicado a 443 msnm en la localidad de Las Higueras, Departamento Río Cuarto, Córdoba. El suelo es un Haplustol típico con 1,6 % de materia orgánica. El área cuenta con una temperatura media anual de 16,5° C. El período libre de heladas es de 240 días (entre septiembre y mayo). Las precipitaciones poseen un valor medio de 800 mm anuales con un régimen monzónico irregular con aproximadamente 80 % de las precipitaciones concentradas en el semestre más cálido (octubre a marzo).

Durante las campañas agrícolas 2004/2005, 2006/07 y 2007/08 se sembraron cinco líneas endocriadas, elegidas en base a una prueba *top cross* para la determinación de la ACG, y los 20 híbridos simples obtenidos a partir del cruzamiento dialélico completo de dichas líneas. Los ensayos se sembraron el día 19 de octubre de 2004, 10 de noviembre de 2006 y 7 de noviembre de 2007. Los materiales de dispusieron en un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones. Cada parcela consistió en dos surcos a 0,70 metros de separación y una longitud de 3 metros (4,20 m²). Se sembraron a razón de cinco semillas por metro lineal, con doble golpe, para (con un raleo posterior) garantizar una densidad de cosecha de aproximadamente 71.000 plantas ha⁻¹. La unidad experimental consistió en

plantas individuales realizándose tres submuestreos por parcela.

Se evaluaron caracteres morfofisiológicos, en estado R_3 - R_4 y al final del ciclo del cultivo:

- Morfofisiológicos: altura total (m) de la planta, número de tallos por planta, número de espigas por planta, número de espigas por tallo.

- En estado R_3 - R_4 : peso verde (g) de planta entera, peso verde (g) de espigas sin chala por planta, porcentaje de espiga verde sin chala por planta, porcentaje de espiga seca sin chala por planta, porcentaje de materia seca de espiga sin chala por planta, peso seco (g) de planta entera, peso seco (g) de espigas sin chala por planta, porcentaje de materia seca total.

- Al final del ciclo del cultivo: peso seco (g) de planta entera, peso seco (g) de espigas sin chala por planta, número de granos por planta, peso (g) de granos por planta, peso (g) de 1000 granos, índice de cosecha.

Los valores obtenidos de los ensayos de ACE se analizaron mediante un análisis dialélico conjunto (Griffins, 1956) utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + a_k + ga_{ik} + ga_{jk} + sa_{ijk} + r_1 + \epsilon_{ij}$$

donde, μ = media general del ensayo; g_i = efectos de la aptitud combinatoria general asociada al progenitor i; g_j = efectos de la aptitud combinatoria general asociada al progenitor j; s_{ij} = efectos de la aptitud combinatoria específica entre los progenitores i y j; a_k = efecto del ambiente k; ga_{ik} y ga_{jk} = efectos de la interacción entre la ACG de los progenitores i y j y el ambiente k; sa_{ijk} = interacción de la aptitud combinatoria específica entre los progenitores i y j y el ambiente k; r_1 = efecto de la repetición l; ϵ_{ij} = error experimental. Se aclara que en este modelo Y_{ij} y ϵ_{ij} son, respectivamente, la media experimental y el error aleatorio medio asociados a los tratamientos de orden ij (Cruz, 2006).

Este modelo, correspondiente al modelo experimental I propuesto por Griffins (1956), incluye los progenitores, híbridos F_1 con recíprocos, aleatorizados en los bloques respectivos. El análisis se llevó a cabo utilizando el aplicativo computacional en genética y estadística GENES (Cruz, 2006). Los

significados de los efectos genéticos de ACG y ACE de las variables medidas se evaluaron con una prueba “t”, a través de su error estándar. El error estándar de una media de tratamiento se calculó a partir de la raíz cuadrada del cociente entre el cuadrado medio del error del residuo y el número de repeticiones (Steel y Torrie, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos se desarrollaron bajo condiciones hídricas adecuadas, donde las precipitaciones de los tres ciclos superaron al promedio histórico correspondiente. Las campañas 2004/05 y 2006/07 se iniciaron con menor recarga hídrica en el perfil del suelo debido a un atraso en el inicio de las lluvias primaverales. Durante el período crítico del cultivo, las precipitaciones fueron abundantes por lo que el cultivo no experimentó periodos de deficiencia de humedad edáfica.

Los valores medios y desvíos para los caracteres considerados en los tres años de ensayo se resumen en la Tabla 1. Algunos de los caracteres de producción medidos en R_3 - R_4 y fin de ciclo se proyectaron a hectárea con el objetivo de dimensionar los valores obtenidos. La materia seca total en estado lechoso-pastoso ($62.900 \text{ kg ha}^{-1}$) fue similar y en algunos casos superior a los encontrados por Arias *et al.* (2003), Centeno *et al.* (2009; 2010), Di Nucci de Bedendo *et al.* (2009) y De León *et al.* (2011) empleando distintos híbridos comerciales.

Los valores de MS total observada a fin de ciclo ($24.345 \text{ kg ha}^{-1}$) se corresponden con los valores observados en ensayos sobre maíz para uso como pastura diferida para la alimentación de ganado bovino (Maresca *et al.*, 2006; Castaldo *et al.*, 2009). El peso de grano promedio registrado ($10.106 \text{ kg ha}^{-1}$) fue superior o similar al obtenido en diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires, en suelos con 2,5-3% de materia orgánica y 180 - 200 kg ha^{-1} de urea (Cirilo, 2004; Ferraris, 2004; Ventimiglia y Torrens Baudrix, 2012).

Los valores de F y el significado obtenido de los análisis de varianza conjuntos de los caracteres medidos en los híbridos simples se presentan en las Tablas 2, 3 y 4. La ACG fue altamente significativa para los caracteres altura de planta y espigas por

planta y significativa para espigas por tallo y peso verde de espigas en estado R_3 - R_4 . La ACE fue muy altamente significativa en altura de planta, peso verde de planta entera y peso verde de espigas en estado R_3 - R_4 ; los caracteres tallos por planta y espigas por tallo presentaron ACE significativa. La ACE recíproca fue no significativa en los cuatro caracteres (Tabla 2). No se observaron interacciones con el año, salvo para altura de planta donde la ACG tuvo interacción altamente significativa.

Los efectos de ACG fueron altamente significativos para porcentaje de espiga verde y porcentaje de espiga seca en estado R_3 - R_4 . Los efectos de ACE fueron significativos para los seis caracteres (muy altamente significativos en porcentaje de espiga seca, porcentaje de materia seca de espiga, peso seco de planta entera y peso seco de espigas en estado R_3 - R_4). El ER presentó significación únicamente en porcentaje de espiga verde en estado R_3 - R_4 .

La interacción ACG x Año fue altamente significativa en % de materia seca total y la interacción de ER x Año fue significativa en los caracteres peso seco de planta entera y peso seco de espigas. Los caracteres de fin de ciclo (Tabla 4) mostraron efectos de ACG muy altamente significativos en el peso de 1000 semillas, mientras que los efectos de ACE fueron muy altamente significativos en todos ellos, salvo para índice de cosecha que se mostraron altamente significativos. Los efectos de ACE recíproca y las interacciones de aptitud combinatoria y año fueron no significativos en todos los casos.

Caracteres morfofisiológicos

Los valores de ACE para los caracteres morfofisiológicos evaluados previo al corte en R_3 - R_4 se presentan en la Tabla 5. Trece híbridos simples presentaron efectos significativos para altura de planta, donde se destacan 4×20 , 20×4 , 20×26 y 26×3 como los de mayor ACE para este carácter. Los híbridos 3×4 , 4×3 , 26×4 y 26×20 acompañan ese efecto con la relación espiga/tallo y 28×4 con número de espigas por planta, respectivamente. No existen valores significativos de efecto de ACE para tallos por planta.

Caracteres evaluados en estado R_3 - R_4 (grano lechoso-pastoso)

En la Tabla 6 se resumen los valores de ACE de los híbridos analizados para los caracteres antes descritos. En total, 10 HS muestran un efecto de ACE significativa en al menos un carácter. Se destaca el HS 3x26 por tener la mayor cantidad de caracteres con valores significativos de ACE positivos; éste y 28x4 son los híbridos de mayor efecto de ACE para peso verde de espiga. El HS 26x3 sobresalió en los caracteres peso seco de planta entera y peso seco de espigas, mientras que 20x4 se destaca en porcentaje de materia seca de espiga y ambos pesos secos.

Se observa que el híbrido 28x4, que involucra como progenitor femenino una línea con ACG negativa (línea 28), presentó un alto valor de ACE para peso verde de planta entera. Este efecto fue descrito en maíces tropicales y subtropicales donde progenitores con efectos bajos o negativos de ACG produjeron cruza con alto valores en los caracteres respectivos (Guillén-de la Cruz *et al.*, 2009; De la Cruz-Lázaro *et al.*, 2010).

Caracteres evaluados en fin de ciclo del cultivo

Los efectos de la ACE para los caracteres de fin de ciclo se muestran en la Tabla 7. Nueve híbridos simples presentaron valores positivos y significativos de ACE. El híbrido 28x4 sobresalió por tener los mayores valores de ACE para peso seco de planta entera y espigas y número y peso de granos; 20x26 se destacó en el mayor número de caracteres positivos incluyendo peso seco de planta

entera y espiga, número y peso de granos e índice de cosecha. 4x20 y 4x28 revelan valores aceptables para peso seco de planta entera, aunque el segundo destaca en peso seco de espigas, número y peso de granos.

La importancia de cada híbrido simple se cuantificó en relación a sus efectos de aptitud combinatoria específica posicionándolos de acuerdo a la cantidad de caracteres en donde dicho efecto de ACE fue positivo y significativo. De esta manera se identificaron ocho híbridos simples que reúnen las características buscadas, tanto para uso como forraje para ensilar en estado lechoso-pastoso, como para pastoreo diferido o producción de grano en fin de ciclo (Tabla 8).

El híbrido 28x4 se destaca como posible genotipo para uso doble propósito; los híbridos 20x26, 4x28, 4x20 y 4x3 tienen tendencia a la producción de forraje diferido o grano; y los híbridos 20x4, 3x26 y 26x3 resultan favorables para la producción de forraje para ensilar en estado R_3 - R_4 .

El HS 26x3, incluido en el listado anterior, debió eliminarse del programa de mejoramiento debido a la escasa semilla existente y a la gran dificultad de producción de semilla viable que presenta el mismo. Esto es debido a que la línea 26, involucrada en este híbrido como progenitor femenino, posee grandes inconvenientes a nivel de fertilidad y sanidad.

Si bien se pudieron detectar híbridos de los diferentes tipos forrajeros considerados y en especial del tipo doble propósito, será necesario confirmar su comportamiento y productividad en diferentes ambientes regionales contrastándolos con testigos comerciales.

Variable	2004/05	2006/07	2007/08	Media
AP	210,00 ± 23,75	112,80 ± 26,38	206,31 ± 23,40	176,37±51,27
TP	1,47 ± 0,38	1,10 ± 0,20	2,06 ± 0,68	1,54±0,61
EP	1,51 ± 0,44	1,48 ± 0,43	2,46 ± 0,86	1,81±0,76
ET	1,06 ± 0,24	1,36 ± 0,32	1,30 ± 0,37	1,24±0,34
PVTLP	762,27 ± 242,15	803,22 ± 234,65	1093,65 ±	886,38±319,63
PVELP	257,50 ± 84,48	170,74 ± 56,80	225,82 ± 91,72	218,02±86,56
% EVLP	35,20 ± 7,52	21,28 ± 5,63	20,68 ± 3,68	25,72±8,90
% ESLP	51,20 ± 10,40	29,28 ± 8,72	34,44 ± 8,61	38,31±13,19
% MSELP	66,01 ± 9,15	37,13 ± 10,45	32,09 ± 8,74	45,08±17,70
PSTLP	302,17 ± 123,38	215,54 ± 64,83	198,28 ± 62,76	238,67±98,97
PSELP	157,75 ± 76,79	68,45 ± 31,92	72,42 ± 30,11	99,54±65,49
% MSLP	43,44 ± 7,16	27,02 ± 6,48	18,25 ± 2,57	29,57±11,94
PSTFC	251,48 ± 72,84	304,60 ± 99,09	472,62 ± 216,36	342,90±171,42
PSEFC	156,81 ± 51,32	175,68 ± 64,23	197,33 ± 93,62	176,61±73,51
NG	551,19 ± 184,29	640,35 ± 250,07	598,68 ± 267,65	596,74±238,49
PG	129,59 ± 46,92	142,71 ± 56,25	154,73 ± 73,32	142,34±60,45
P1000	234,47 ± 31,52	229,99 ± 30,14	258,74 ± 31,79	241,07±33,50
IC	0,54 ± 0,21	0,45 ± 0,11	0,32 ± 0,08	0,43±0,17

Tabla 1. Valores medios y desvíos estándares para caracteres analizados en Ensayos de Aptitud Combinatoria Específica (EACE) de líneas endocriadas e híbridos simples de maíz en tres ciclos de producción (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref.: AP= altura de planta (cm); TP= número de tallos por planta; EP= número de espigas por planta; ET= número de espigas por tallo; PVTLP= peso verde (g) de planta entera en R3-R4; PVELP= peso verde (g) de espigas sin chala por planta en R3-R4; %EVLP= % de espiga verde por planta en R3-R4; % ESLP= % de espiga seca por planta en R3-R4; % MSELP= % de materia seca de espigas sin chala en R3-R4; PSTLP= peso seco (g) de planta entera en R3-R4; PSELP= peso seco (g) de espigas sin chala/planta en R3-R4; % MSLP= % de materia seca total en R3-R4; PSTFC= peso seco (g) de planta entera en fin de ciclo; PSEFC= peso seco (g) de espigas sin chala por planta en fin de ciclo; NG= número de granos por planta; PG= peso (g) de granos por planta; P1000= peso (g) de 1000 granos; IC= índice de cosecha.

Fuente de Variación	AP	TP	EP	ET
Híbrido	12,04 ns	2,20 ns	2,68 ns	2,10 ns
ACG.	8,04 **	3,48 ns	7,96 **	6,87 *
ACE.	32,48 ***	2,42 *	2,20 ns	2,53 *
ER	0,56 ns	1,21 ns	0,61 ns	0,51 ns
Híbrido x Año	1,06 ns	0,76 ns	0,13 ns	0,38 ns
ACG x Año	2,54 **	0,82 ns	0,17 ns	0,23 ns
ACE x Año	0,67 ns	0,88 ns	0,08 ns	0,43 ns
ER x Año	0,85 ns	0,62 ns	0,15 ns	0,40 ns

Tabla 2. Valores de F y significación del análisis de varianza conjunta para caracteres morfofisiológicos en los Ensayos de Aptitud Combinatoria Específica (EACE) de híbridos simples y líneas endocriadas de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

REF: AP= altura de planta (cm); TP= número de tallos por planta; EP= número de espigas por planta; ET= número de espigas por tallo; ACG= aptitud combinatoria general; ACE.= aptitud combinatoria específica directa; ER= ACE efecto recíproco. *, **, *** = significativo para p<0,05, p<0,01 y p<0,001, respectivamente; ns = no significativo.

Fuente de Variación	PVTLP	PVELP	%EVL	%ESLP	%MSELP	PSTLP	PSELP	%MSLP
Híbrido	4,04ns	4,68ns	4,69ns	7,12ns	4,20ns	3,14ns	2,87ns	2,24ns
ACG.	3,56ns	4,34*	7,67**	9,62**	3,33ns	1,20ns	1,85ns	2,74ns
ACE.	8,85***	11,30***	2,61*	11,34***	7,64***	11,06***	6,23***	2,51*
ER	0,38ns	0,31ns	3,48**	1,17ns	1,97ns	0,46ns	0,49ns	1,31ns
Híbrido x Año	0,57ns	0,55ns	0,44ns	0,49ns	0,76ns	1,12ns	1,34ns	1,29ns
ACG x Año	0,52ns	0,38n	0,99ns	0,83ns	1,77ns	0,85ns	0,88ns	3,22**
ACE x Año	0,52ns	0,47n ^s	0,45ns	0,41ns	0,54ns	0,66ns	1,25ns	0,88ns
ER x Año	0,65ns	0,69ns	0,21ns	0,43ns	0,56ns	1,69*	1,62*	0,93ns

Tabla 3. Valores de F y significación del análisis de varianza conjunta para caracteres en estado R3-R4 en los Ensayos de Aptitud Combinatoria Específica (EACE) de híbridos simples y líneas endocriadas de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref: PVTLP= peso verde (g) de planta entera en R3-R4; PVELP= peso verde (g) de espigas sin chala por planta en R3-R4; % EVLP= % de espiga verde por planta en R3-R4; % ESLP= % de espiga seca por planta en R3-R4; % MSELP= % de materia seca de espigas sin chala en R3-R4; PSTLP= peso seco (g) de planta entera en R3-R4; PSELP= peso seco (g) de espigas sin chala/planta en R3-R4; % MSLP= % de materia seca total en R3-R4; ACG= aptitud combinatoria general; ACE= aptitud combinatoria específica directa; ER= ACE. efecto recíproco. *, **, *** = significativo para $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente; ns= no significativo.

Fuente de Variación	PSTFC	PSEFC	NG	PG	P1000	IC
Híbrido	3,70 ns	5,62 ns	3,16 ns	5,27 ns	4,97 ns	3,43 ns
ACG	2,74 ns	1,59 ns	0,23 ns	0,88 ns	16,83 ***	2,86 ns
ACE	6,63 ***	11,01 ***	5,65 ***	9,36 ***	5,67 ***	4,93 **
ER	1,22 ns	1,37 ns	1,15 ns	1,56 ns	0,44 ns	1,02 ns
Híbrido x Año	0,74 ns	0,62 ns	1,11 ns	0,77 ns	0,62 ns	0,42 ns
ACG. x Año	0,96 ns	0,70 ns	1,24 ns	0,68 ns	0,53 ns	0,33 ns
ACE x Año	0,71 ns	0,65 ns	1,29 ns	0,91 ns	0,62 ns	0,56 ns
ER x Año	0,69 ns	0,56 ns	0,88 ns	0,68 ns	0,65 ns	0,32 ns

Tabla 4. Valores de F y significación del análisis de varianza conjunta para caracteres en fin de ciclo en los Ensayos de Aptitud Combinatoria Específica (EACE) de híbridos simples y líneas endocriadas de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref.: PSTFC= peso seco (g) de planta entera en fin de ciclo; PSEFC= peso seco (g) de espigas sin chala por planta en fin de ciclo; NG= número de granos por planta; PG= peso (g) de granos por planta; P1000= peso (g) de 1000 granos; IC= índice de cosecha; ACG= aptitud combinatoria general; ACE= aptitud combinatoria específica directa; ER= ACE efecto recíproco. *, **, *** = significativo para $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente; ns= no significativo.

Material Genético	AP	TP	EP	ET
3x3	-24,44**	-0,06	-0,18	0,09
3x4	5,37	-0,01	-0,01	-0,17*
3x20	9,2*	0,04	0,06	-0,002
3x26	9,17*	0,04	0,22	0,02
3x28	0,7	-0,01	-0,01	0,06
4x3 ⁽¹⁾	1,11	0,01	-0,01	-0,17*
4x4	-36,11**	-0,09	0,16	0,46**
4x20	15,78**	0,02	-0,1	-0,06
4x26	5,09	0,06	-0,17	-0,11
4x28	9,87*	0,02	0,11	-0,13
20x3 ⁽¹⁾	8,37*	0,02	0,04	-0,06
20x4 ⁽¹⁾	15,41**	0,05	-0,16	-0,14
20x20	-46,96**	-0,09	-0,22	-0,01
20x26	13,18**	0,01	0,24	0,06
20x28	8,8*	0,02	0,01	0,01
26x3 ⁽¹⁾	13,89**	0,03	0,03	0,07
26x4 ⁽¹⁾	7,41 ^a	0,05	-0,28	-0,15 ^a
26x20 ⁽¹⁾	7,99 ^a	0,03	0,11	0,18 ^a
26x26	-32,96**	-0,12	-0,2	0,06
26x28	5,52	0,01	-0,09	-0,04
28x3 ⁽¹⁾	0,89	0,01	0,12	0,11
28x4 ⁽¹⁾	8,85*	0,02	0,31 ^a	-0,06
28x20 ⁽¹⁾	7,04 ^a	0,04	-0,05	0
28x26 ⁽¹⁾	3,48	0,013	-0,09	0
28x28	-24,89**	-0,05	0,06	0,01

Tabla 5. Valores de aptitud combinatoria especifica para caracteres morfofisiológicos en 20 híbridos simples y 5 líneas endocriadas progenitoras de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref.: AP= altura de planta (cm); TP= número de tallos por planta; EP= número de espigas por planta; ET= número de espigas por tallo. Significación a través de una prueba t: asinificativo al 10 %; *significativo al 5 %; **significativo al 1 %. (1) híbrido simple analizado a través de su efecto recíproco.

Material Genético	PVTLP	PVELP	%EVLP	%ESLP	%MSELP	PSTLP	PSELP	%MSLP
3x3	-	-84,14**	-0,02	-0,06 ^a	-2,87	-70,42*	-	-1,52
3x4	262,89**	14,5	-0,01	-0,01	0,31	0,02	44,08**	0,07
3x20	120,07	27,2	0,01	0,04	2,77	30,15	18,03	-0,64
3x26	92,93	53,08**	0,03*	0,04	2,78	52,23 ^a	36,89**	3,01 ^a
3x28	-46,77	-10,62	-0,003	-0,01	-2,98	-11,98	-6,06	-0,93
4x3 ⁽¹⁾	69,56	8,09	0	0,01	1,04	-14,55	-5,827	0,093
4x4	-	-87,05**	-0,03*	-0,09**	-9,36**	-74,21*	-	-3,28*
4x20	279,86**	24,37	0,02	0,02	0,52	22,8	42,64**	1,55
4x26	53,8	10,68	0,01	0,06 ^a	5,36*	13,89	14,57	1,5
4x28	122,05	37,5 ^a	0,01	0,02	3,18	37,5	21,58	0,17
20x3 ⁽¹⁾	158,81*	24,7	-0,01	0,02	1,79	17,01	8,07	-0,52
20x4 ⁽¹⁾	31,73	21,56	0,03*	0,05 ^a	6,51*	46,62 ^a	29,09*	2,62
20x20	-	-	-0,02	-0,09**	-7,87**	-	-	-1,55
20x26	412,02**	112,81**	32,23	-0,004	0,01	118,33*	54,78**	-0,37
20x28	139,86 ^a	29,03	0,001	0,02	3,44	36,64	12,21	1,02
26x3 ⁽¹⁾	98,29	36,76 ^a	-0,01	0,03	1,45	28,73	13,28	0,02
26x4 ⁽¹⁾	108,06	27,55	0,005	0,05 ^a	2,76	79,67*	51,11**	0,03
26x20 ⁽¹⁾	88,13	28,6	-0,004	0,03	-0,86	17,02	12,98	-1,11
26x26	121,05	-97,07**	-0,04**	-0,12**	-8,82**	-	-	-4,38**
26x28	-269**	1,08	0,01	0,01	-0,47	111,94*	68,55**	0,24
28x3 ⁽¹⁾	28,87	1,86	0,007	0,01	-1,23	9,19	4,88	0,84
28x4 ⁽¹⁾	-13,27	183,01*	53,21*	0,015	0,02	-7,96	-0,99	0,41
28x20 ⁽¹⁾	89,42	39,29*	0,021	0,04	3,3	28,17	16,46	0,88
28x26 ⁽¹⁾	-10,41	-3,31	0,02	0,007	-0,99	17,21	13,11	1,88
28x28	-	-56,99**	-0,02	-0,05	-3,17	-19,01	-11,1	-
	202,44**	-	-	-	-	-63,43*	33,68**	-0,49

Tabla 6. Valores de aptitud combinatoria específica para caracteres en estado R3-R4 en 20 híbridos simples y 5 líneas progenitoras de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref: PVTLP= peso verde (g) de planta entera en R3-R4; PVELP= peso verde (g) de espigas sin chala por planta en R3-R4; % EVLP= % de espiga verde por planta en R3-R4; % ESLP= % de espiga seca por planta en R3-R4; % MSELP= % de materia seca de espigas sin chala en R3-R4; PSTLP= peso seco (g) de planta entera en R3-R4; PSELP= peso seco (g) de espigas sin chala/planta en R3-R4; % MSLP= % de materia seca total en R3-R4. Significación a través de una prueba t: significativo al 10 %; *significativo al 5 %; **significativo al 1 %. (1) híbrido simple analizado a través de su efecto recíproco.

Material genético	PSTFC	PSEFC	NG	PG	P1000	IC
3x3	-75,35 ^a	-51,42**	-149,35**	-46,28**	-	-0,06 ^a
3x4	34,75	21,06	32,54	15,65	10,33	-0,01
3x20	16,83	11,34	59,86	12,71	7,71	0,04
3x26	19,15	15,63	36,26	13,52	0,77	0,03
3x28	4,61	3,39	20,69	4,4	4,99	-0,003
4x3 ⁽¹⁾	46,68	37,84*	79,33	29,77*	12,97 ^a	0,01
4x4	-170,67**	-103,5**	-276,5	-87,63**	-	-0,12**
4x20	65,63 ^a	24,17	89,71 ^a	23,65 ^a	9,25	0,06 ^a
4x26	-3,12	18,02	11,18	11,19	13,95 ^a	0,03
4x28	73,42 ^a	40,26*	143,08*	37,15**	6,23	0,04
20x3 ⁽¹⁾	0,98	-0,7	13,8	2,52	4,83	0,03
20x4 ⁽¹⁾	58,52	22,33	96,26 ^a	21,25	0,68	0
20x20	-180,59**	-109,67**	-403,64**	-94,9	-	-0,23**
20x26	72,94 ^a	47,47**	156,9**	40,9**	6,9	0,11**
20x28	25,2	26,69	97,17 ^a	17,64	2,37	0,02
26x3 ⁽¹⁾	24,73	-1,8	-37,39	-2,14	4,32	-0,01
26x4 ⁽¹⁾	19,42	21,72	30,71	19,69	13,86 ^a	0,06 ^a
26x20 ⁽¹⁾	4,38	14,86	27,49	8,88	5,56	0,16**
26x26	-107,35**	-85,44**	-194,03**	-69,79**	-	-0,17**
26x28	18,39	4,32	-10,32	4,18	8,13	0,01
28x3 ⁽¹⁾	3,57	3,84	21,9	9,85	10,84	0,007
28x4 ⁽¹⁾	133,24**	56,39 ^a	199,54**	48,51**	5,23	0,03
28x20 ⁽¹⁾	0,46	23,45	61,18	8,85	-0,08	0,04
28x26 ⁽¹⁾	-21,87	-20,87	-67,27	-16,3	-0,79	-0,01
28x28	-121,61**	-74,65**	-250,62**	-63,37**	-	-0,06
					21,73**	

Tabla 7. Valores de aptitud combinatoria especifica para los caracteres analizados en fin de ciclo en 20 híbridos simples y 5 líneas endocriadas progenitoras de maíz (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref: PSTFC= peso seco (g) de planta entera en fin de ciclo; PSEFC= peso seco (g) de espigas sin chala por planta en fin de ciclo; NG= número de granos por planta; PG= peso (g) de granos por planta; P1000= peso (g) de 1000 granos; IC= índice de cosecha. Significación a través de una prueba t: asinificativo al 10 %; *significativo al 5 %; ** significativo al 1 %. (1) híbrido simple analizado a través de su efecto recíproco.

Híbrido	Nº de caracteres según su significación				Nº de caracteres según el estado fenológico		
	0,01	0,05	0,1	Total	MF	LP	FC
28x4	4	2	2	8	2	2	4
20x26	5		2	7	1	1	5
20x4	1	4	2	7	1	5	1
3x26	2	3	1	6	1	5	
4x28	2	2	2	6	1	1	4
4x20	1		4	5	1		4
26x3	3		1	4	1	3	
4x3		2	1	3	1		2

Tabla 8. Número de caracteres con valor positivo y significativo de aptitud combinatoria especifica para los híbridos simples de maíz seleccionados (2004/05, 2006/07, 2007/08). Río Cuarto, Córdoba.

Ref.: MF= caracteres morfofisiológicos; LP= caracteres medidos en estado R3-R4; FC= caracteres medidos a fin de ciclo.

CONCLUSIONES

Los ensayos permitieron determinar la aptitud combinatoria específica de cinco líneas endocriadas de maíz a través de los 20 híbridos simples originados en el cruzamiento dialélico. Se identificaron materiales con diferentes aptitudes de uso.

El híbrido simple 28x4 fue seleccionado por su ACE presentando valores promisorios como doble propósito. Los híbridos simples 20x26, 4x28, 4x20 y 4x3 mostraron un comportamiento similar, mejor adaptados a la producción de forraje diferido y grano. Por último, el análisis dialélico detectó a los híbridos simples 20x4 y 3x26 como materiales mejor adaptados a la producción de forraje en estado R_3 - R_4 .

BIBLIOGRAFÍA

- Allard R.W. (1978) Principios de la mejora genética de las plantas. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Arias S., Freddi A.J., Sánchez O., Arzadún M. (2003) Rendimiento de materia seca y composición morfológica de híbridos de sorgo y maíz para silaje de planta entera. XXVI Congr. Arg. Prod. Animal, RAPA 23 Supl. 1: 221-222. Mendoza.
- CACF (2012) Cámara Argentina de Contratistas Forrajeros.
- Castaldo A., Pariani A., Bulnes N., Illuminati H. (2009) Evaluación de un cultivo de maizal en estado diferido. Ciencia Veterinaria 11 (1): 37-41.
- Castañón-Nájera G., Latournerie-Moreno L., Mendoza-Elos M. (2005) Macro de SAS-IML para analizar los diseños II y IV de Griffins. Universidad y Ciencia 21: 27-35.
- Centeno A., Cortés E., Gallo E. (2009) Evaluación de híbridos de maíz para silo. Campaña 2008-09. Hoja de Información Técnica. UEE-INTA San Francisco-IPEM N° 222.
- Centeno A., Cortés E., Ciacci M.B. (2010) Evaluación de híbridos de maíz para silo. Campaña 2009-10. Hoja de Información Técnica. UEE San Francisco. INTA. http://www.produccion-Animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/148informe_maices_sileros_09-10.pdf (acceso julio 2012).
- Cirilo A.G. (2004) Fecha de siembra y rendimiento en maíz. IDIA XXI 6: 122-127.
- Crow J.F. (1998) 90 Years Ago: The Beginning of Hybrid Maize. Genetics 148: 923-928.
- Cruz C.D. (2006) Programa Genes: Biometría. Editora UFV. Viçosa (MG), Brasil.
- De la Cruz-Lázaro E., Castañón-Nájera G., Brito-Manzano N., Gómez-Vásquez A., Robledo-Torres V., Lozano del Río A. (2010) Heterosis y aptitud combinatoria de poblaciones de maíz tropical Φ YTON (Buenos Aires) 79 (1): 11-17.
- De León M., Giménez R.A., Ruolo M.S. (2011) Caracterización y variabilidad de distintos genotipos de maíz para ensilaje. EEA INTA Manfredi. <http://www.inta.gov.ar/documentos/caracterizacion-y-variabilidad-de-distintos-genotipos-de-maiz-para-ensilaje/> (acceso julio 2012).
- Di Nucci de Bedendo E., Firpo M.V., Martínez M. Del H. (2009) Aptitud silera de híbridos de maíz (Campaña 2008/09). INTA EEA Paraná. <http://inta.gov.ar/parana/info/documentos/aptitud-silera-de-hibridos-de-maiz-campaña-2008-09/> (acceso julio 2012).
- Ferraris G. (2004) Ensayo comparativo de híbridos comerciales de maíz en el área de Colón-Wheelwright. Campaña 2003/04. Proyecto Regional Agrícola. INTA Pergamino. <http://www.elsitioagricola.com/articulos/ferraris/EnsayocomparativodehibridoscomercialesdeMaizenelareadeColon-Wheelwright.asp> (acceso junio 2012).
- Fussell B. (1999) The story of corn. North Point Press, NY, USA.

- Gallais A., Pollacsek M., Huguet L. (1976) Possibilites de selection du maïs en tant que plant fourragere. Ann. Amelior. Plantes 26: 591-605.
- Gorostegui J. (1971) Variedades vegetales del INTA, cultivares creados e introducidos desde 1958. Serie: Colección agropecuaria del INTA 19. Buenos Aires.
- Grassi E. (2009) Caracterización genética de maíz local con fines forrajeros. Tesis Maestría en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba.
- Grassi E., Szpiniak B., Ferreira V. (2006) Estimación de la productividad y variación de líneas endocriadas de maíz para doble propósito. Rev. Univ. Nac. Río Cuarto 26 (1-2): 3-13.
- Grassi E., Reynoso L., Brun A., Ferreira A., Castillo E., Ferreira V. (2009) Líneas endocriadas de maíz: materia seca, aptitud combinatoria y agrupamiento según posibilidades de uso. Rev. Univ. Nac. de Río Cuarto 29 (1-2): 19-36.
- Griffins B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. Jour. Biol. Sci. 9: 463-493.
- Guillén-De la Cruz E., De la Cruz-Lázaro E., Castañon-Nájera G., Osorio-Osorio R., Brito-Manzano N.P., Lozano-Del Río A., López-Noverola U. (2009) Aptitud combinatoria general y específica de germoplasma tropical de maíz. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10: 101-107.
- Gutiérrez del Río E., Espinoza Banda A., Palomo Gil A., Lozano García J., Antuna O. (2004) Aptitud combinatoria de híbridos de maíz para la comarca Lagunera. Rev. Fitotecnia Mexicana 27 (1): 7-11.
- Hallauer A.R., Miranda Filho J.B. (1988) Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames, Iowa. U.S.A.
- Iltis H., Doebley J. (1980) Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. Amer. J. Bot. 67 (6): 994-1004.
- INDEC (2005) Instituto Nacional de Estadística y Censos. Encuesta Nacional Agropecuaria. Buenos Aires. Argentina.
- Lonnquist J. (1964) A modification of the ear-to-row procedure for the improvement of maize populations. Crop Sci. 4: 227-228.
- Magoja J., Pischedda G. (1988) Aptitud combinatoria de progénies S1 derivadas de una población con introgresión de germoplasma silvestre. XIX Congreso Argentino de Genética. UNJujuy. 28 de agosto-1 de septiembre. p.78.
- Maizar (2012) Asociación Maíz Argentino.
- Maresca S., Echeverri D., Quiroz J.L. (2006) Ensayo comparativo de sorgo y maíz diferido para vacas de cría. EEA INTA Cuenca del Salado; EEA INTA Balcarce. <http://www.inta.gob.ar/documentos/ensayo-comparativo-de-sorgo-y-maiz-diferido-para-vacas-de-cria.pdf> (acceso abril 2012).
- Paccapelo H., Molas M. (1996) Caracterización de una población de maíz forrajero con introgresión de *Zea diploperennis*. Revista de investigaciones Agropecuarias Vol. 27 (1): 33-38.
- Paliwal R.L., Granados G., Lafitte H.R., Violic A.D., Marathe J.P. (2001) El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Usos del maíz. En: Colección FAO: Producción y Protección Vegetal, N° 28. FAO, Rome (Italy).
- Quemé de León J., Larios Bobadilla L., Pérez Rodas C., Soto León N. (1991) Aptitud combinatoria y predicción de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) de grano amarillo a partir de cruas dialélicas, evaluadas en dos localidades de la zona baja de Guatemala, 1989. Agronomía Mesoamericana 2: 24-30.

- Reynoso L. (1996) Variabilidad genética para macollamiento y rebrote en el género *Zea*. MSc. Tesis Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. Fac. Cs. Agrarias, UN Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Russell A.W. (1973) Desarrollo y evaluación de líneas endocriadas de maíz. Fundación Cargill, Publicación N° 2, Buenos Aires, Argentina.
- SIIA (2012) Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina.
- Sprague G.F., Tatum L.A. (1942) General vs. specific combining ability in single crosses of corn. *J. Amer. Soc. Agron.* 34: 923-932.
- Steel D., Torrie J. (1988) Bioestadística: Principios y procedimientos. Editorial McGraw-Hill/Interamericana, México.
- Torrecillas M., Bertoia L. (2000) Aptitud combinatoria para caracteres forrajeros en poblaciones nativas y compuestos raciales de maíz en Argentina. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 15: 80-90.
- Troiani H., Paccapelo H., Golberg A. (1988) Descripción botánica del híbrido interespecífico entre *Zea mays* x *Zea diploperennis*. *Rev. Fac. Agronomía. UNLPam.* Vol 3 N° 2: 53-58.
- Ventimiglia L., Torrens Baudrix L. (2012) Ensayo híbridos de maíz 2011/12 (9 de Julio B. Aires). EEA Pergamino. AER 9 de Julio. INTA Pergamino. http://inta.gob.ar/documentos/ensayo-hibridos-de-maiz-2011-12-9-de-julio-bs.as1/atmultidownload/file?name=Ensayo_Híbridos_maíz_2011_12_9_Julio.pdf (acceso julio 2012).
- Watson S.A. (1988) Corn marketing, processing, and utilization. In: Sprague G.F., Dudley J.W. (Eds.) *Corn and corn improvement*. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA, pp. 882-940.