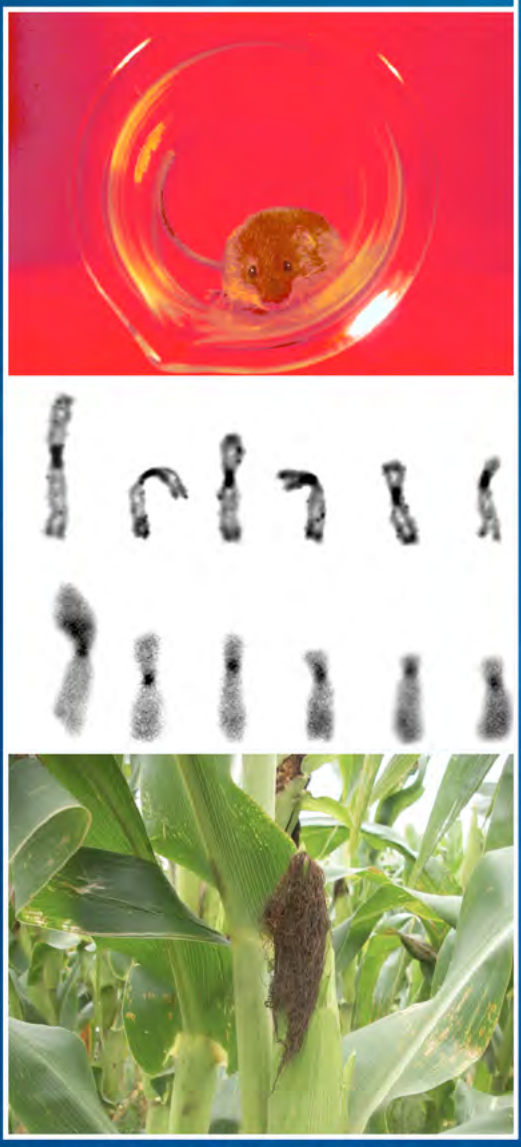
ISSN: 1852-6233

Vol. XXIV Issue 1 2013

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**

JBAG

BUENOS AIRES - ARGENTINA

COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA),
Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP) y
CONICET
Balcarce, Argentina

Editores Asociados:

Citogenética Animal
Dra. Liliana M. Mola
Depto. de Ecología, Genética y Evolución,
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Univ. de Buenos
Aires (UBA) y CONICET
Buenos Aires, Argentina

Citogenética Humana
Dra. Roxana Cerretini
Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS, "Dr Carlos G
Malbrán"
Buenos Aires, Argentina

Citogenética Vegetal
Dr. José Guillermo Seijo
Instituto de Botánica del Nordeste,
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)-CONICET
Corrientes, Argentina

Genética de Poblaciones y Evolución
Dr. Jorge Cladera
Instituto de Genética "Ewald Favret",
Centro de Investigación en Cs. Veterinarias y
Agronómicas,
INTA Castelar,
Argentina

Dra. Noemí Gardenal
Fac. de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,
Universidad Nacional de Córdoba (UNC) y CONICET
Córdoba, Argentina

Dr. Juan César Vilardi
Depto. de Ecología, Genética y Evolución,
Fac. Ciencias Exactas y Naturales, UBA, y CONICET
Buenos Aires, Argentina

Genética Humana y Genética Médica
Dra. María Inés Echeverría
Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Cuyo (UNCu)
Mendoza, Argentina

Dr. Santiago Lippold
Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
(CEMIC)
Buenos Aires, Argentina

Genética Molecular (Animal)
Dr. Guillermo Giovambattista
Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET),
CONICET-Fac. de Cs. Veterinarias, Univ. Nacional de La
Plata (UNLP)
La Plata, Argentina

Genética Molecular (Vegetal)
Dr. Alberto Acevedo
Centro de Investigación de Recursos Naturales,
INTA
Castelar, Argentina

Dr. Andrés Zambelli
Unidad de Negocios Nutrisun–Advanta Semillas SAIC
Balcarce, Argentina

Genética y Mejoramiento Animal
Ing. (M. Sc.) Carlos A. Mezzadra
Área de Investigación en Producción Animal,
EEA Balcarce, INTA y Fac. de Cs. Agrarias, UNMdP
Balcarce, Argentina

Dra. Liliana A. Picardi
Cátedra de Genética, Fac. de Cs. Agrarias,
Universidad Nacional de Rosario (UNR)
Zavalla, Argentina

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal
Dr. Miguel A. Di Renzo
Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)
Córdoba, Argentina

Dr. Ricardo W. Masuelli
EEA La Consulta, INTA
Fac. de Cs. Agrarias, Univ. Nacional de Cuyo (UNCu) y
CONICET,
Mendoza, Argentina

Dra. Mónica Poverene
Depto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
(UNS) y CONICET
Bahía Blanca, Argentina

Mutagénesis
Dr. Alejandro D. Bolzán
Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis,
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) y
CONICET
La Plata, Argentina

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal
Ing. Agr. (M.Sc.) Alberto R.Prina
Instituto de Genética "Ewald Favret",
Centro de Investigación en Cs. Veterinarias y
Agronómicas,
INTA
Castelar, Argentina

Consultor Estadístico:

Ing. Agr. Francisco J. Babinec
EEA Anguil, INTA,
Fac. de Agronomía, Univ. Nacional de La Pampa
(UNLPam)
La Pampa, Argentina

ÍNDICE

5 - 12
Article 1 - opinion
REGULACIONES BIOÉTICAS EN INVESTIGACIONES CON SERES HUMANOS
Martínez Picabea de Giorgiutti E.

13 - 18
Article 2 - review
MAPEO DE QTL PARA RESISTENCIA A MAL DE RÍO CUARTO EN MAÍZ
Di Renzo M.A., Bonamico N.C.

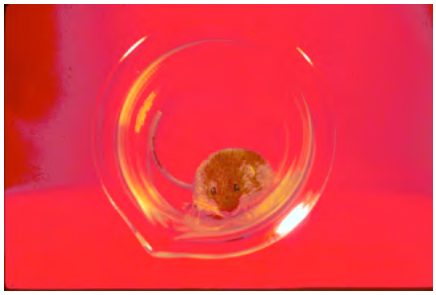
19 - 26
Article 3 - research
IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS L.*) MEDIANTE SSR
Randazzo C.P., Rosso B.S., Pagano E.M.

27 - 31
Article 4 - research
EFFICACY OF ANTICOAGULANT DRUGS AS RODENTICIDES AND GENETIC VARIATION ON *Vkorc1* OF *Mus musculus* FROM BUENOS AIRES PROVINCE (ARGENTINA)
Espinosa M.B.

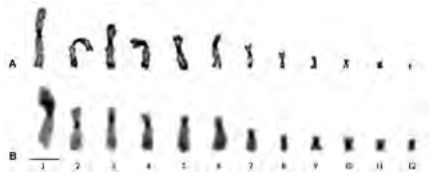
32 - 39
Article 5 - research
C-BANDING PATTERNS AND MEIOTIC BEHAVIOR IN *HYPSIBOAS PULCHELLUS* AND *H. CORDOBAE* (ANURA, HYLIDAE)
Baraquet M., Salas N.E., Martino A.L.

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Tapa



Akodon juvenil
Autor: M.B. Espinosa



Bandas C en cariotipos de anfibios:
(A) *Hypsiboas pulchellus*, (B) *H. cordobae*
Autor: M. Baraquet y col.

Híbrido simple de maíz (*Zea mays*).
Autor: H. Di Santo

BAG
Journal of Basic & A pplied Genetic s

REGULACIONES BIOÉTICAS EN INVESTIGACIONES CON SERES HUMANOS

Martínez Picabea de Giorgiutti E.[1]

[1]C. C. Chumamaya. Villa de Merlo. Provincia de San Luis

empgiorgiutti@gmail.com

ABSTRACT

Bioethics is a relatively new discipline that consists of the systematic analysis of the human conduct with regard to medicine and biology. Its aims are to safeguard humans and their health, as well as to protect the environment and nature in general, following high principles and values. Scientific research involving humans is regulated by bioethical guidelines whose characteristics vary internationally and nationally. These guidelines are in general compulsory, namely, they must be observed. In this work, the main documents on bioethics universally accepted are briefly discussed, as well as others pertaining to the national scene.

Key words: Bioethics, research, human beings.

RESUMEN

La bioética es una disciplina relativamente nueva que se ocupa del estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de la medicina y de la biología en general. Persigue el cuidado y bienestar del ser humano, del medio ambiente y de la naturaleza toda, a la luz de principios y de valores. Cuando las investigaciones científicas involucran a seres humanos, las regulaciones bioéticas que rigen los procedimientos presentan características particulares tanto en el orden internacional como en el nacional. Estas normativas son por lo general vinculantes, es decir de cumplimiento obligatorio. En el presente trabajo se reseñan los principales documentos bioéticos universalmente aceptados y también aquellos otros que son de alcance nacional.

Palabras clave: Bioética, investigación, seres humanos.

El término *Bioética* fue acuñado en 1971 por el médico Van Rensselaer Potter. Con ello quedó formalmente inaugurada un área referida a la aplicación de principios y normas éticas en medicina y en biología. Este amplio marco conceptual supone aristas en común con el derecho, la filosofía, la sociología, el estudio del medio ambiente, y -no pocas veces- el solapamiento con aspectos que se refieren a cuestiones de fe. Pero -reiteramos- no sólo comprende las debidas consideraciones y respeto al ser humano en cualquier circunstancia, sino también el respeto y responsabilidad sobre la naturaleza toda, en su presente y en su futuro. El Diccionario de la Real Academia Española define el vocablo "bioética" como *la disciplina científica que estudia los aspectos éticos de la medicina y la biología en general, así como las relaciones del hombre con los restantes seres vivos* (Real Academia Española, 1992). La Enciclopedia de Bioética, por su parte, considera a esta nueva disciplina como *el estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de las ciencias de la vida y del cuidado de la salud, examinada a la luz de los valores y de los principios* (Reich, 1982). En el terreno de la investigación científica, atañen a la esfera de la bioética los asuntos relativos a la excelencia y prudencia en la elaboración de los protocolos de trabajo, en el diseño de los proyectos que deben incluir las estimaciones estadísticas según los grados de certeza pretendidos, los criterios de selección de muestras y la definición del tamaño de las mismas, las formas de su obtención y archivo, como así también lo concerniente a la interpretación de los resultados y a la destrucción de tejidos biológicos cuando de material humano se trata. Los requisitos incluyen la necesidad de respetar las pautas éticas internacionales, nacionales y de jurisdicciones menores, así como las permanentes actualizaciones de los documentos respectivos, que obligan al investigador y a quienes patrocinan las investigaciones, y que adquieren un carácter particularísimo cuando el ser humano es el sujeto de estudio, aún cuando -como señalamos- las incumbencias de la bioética van más allá de las investigaciones con seres humanos. En realidad, la necesidad de regular jurídicamente las normas éticas en una sociedad, implica en si misma un contrasentido. En efecto: las normas legales constituyen marcos de referencia, vinculantes y obligatorios, para una adecuada convivencia en sociedad; pero no dejan de ser condiciones "de mínima". En tanto que las normas éticas deberían constituir una referencia "de máxima" para el mayor bienestar de la persona. He aquí el meollo de la cuestión. Lo jurídico se establece por consenso, lo ético nunca debería definirse por consenso, sino por principios o valores. Por otra parte, si profundizamos la reflexión podremos fácilmente advertir que el riesgo de no cumplir con la ley es la sanción, en tanto que el de no respetar las convicciones éticas agrega -a la eventual sanción- el peso individual de la conciencia traicionada y el juicio social de la comunidad. Algunas de las primeras normas bioéticas tuvieron su origen como reacción a crímenes, cometidas en nombre de la investigación médica, cuando comenzaron a despertarse conciencias sobre la necesidad de regular conductas. Ejemplo de ello es el Código de Nüremberg publicado el 20 de agosto de 1947, luego de finalizados los juicios al término de la Segunda Guerra Mundial. A partir de entonces, la convocatoria a una serie de reuniones, convenciones y equipos de trabajo, y sus respectivas conclusiones, nos permiten reconocer protagonismos que han hecho posible la formulación de normas que deben regir para el cuidado del ser humano y de la naturaleza.

REGULACIONES BIOÉTICAS INTERNACIONALES

Código de Nüremberg

En el año 1947, y a consecuencia de las atrocidades cometidas por el régimen nazi en los campos de concentración durante la Segunda Guerra Mundial, el Tribunal Internacional de Nüremberg elaboró el llamado Código de Nüremberg. Este documento es hoy reconocido universalmente como el punto de partida de la necesidad de una conciencia ética, y de la urgencia de establecer pautas y regulaciones a tal fin, para cualquier procedimiento médico o experimental sobre seres humanos. En él se señalan diez cuestiones fundamentales:

1) El consentimiento voluntario del sujeto, en libertad, y con capacidad legal para otorgarlo; con ausencia de coacción y la previa comprensión de riesgos y beneficios implícitos.

2) El experimento debe tener como finalidad la obtención de resultados que supongan un bien para la sociedad y que no sean asequibles mediante otros procedimientos.

3) La investigación debe basarse en resultados previos obtenidos mediante estudios en animales y con el conocimiento anticipado del problema a investigar.

4) Se debe evitar todo sufrimiento o daño físico o mental innecesario.

5) La proporción entre riesgos y beneficios será siempre favorable a estos últimos.

6) Para la realización del experimento se deben tomar las medidas necesarias y disponer de las instalaciones adecuadas para proteger al sujeto implicado.

7) No debe realizarse experimento alguno cuando hay una razón *a priori* para suponer que puede ocurrir la muerte o una lesión irreparable.

8) Los investigadores deben ser personas cualificadas.

9) Durante el curso de la investigación el sujeto humano debe disponer de la libertad para retirarse en cualquier momento, si considera que ha llegado a un estado físico o mental en que le parece imposible continuar en él.

10) El investigador pondrá fin al experimento, en cualquier momento, si cree fundadamente que puede dar lugar a lesión, incapacidad o muerte del sujeto experimental.

Declaración de Helsinki

En el año 1964, la Asociación Médica Mundial (AMM) promulgó la llamada *Declaración de Helsinki*, como un cuerpo de principios éticos que deben regir en las investigaciones con seres humanos. Estos principios fueron adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial, reunida en Helsinki. A partir de la fecha de su promulgación ha sido sometida a numerosas revisiones y enmiendas: en la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, Octubre 1975; en la 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, Octubre 1983; en la 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, Septiembre 1989; en la 48ª Asamblea General, Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996; en la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, Octubre 2000; en la Asamblea General, Washington, EUA, 2002, en que se incluyó una Nota de Clarificación del Párrafo 29; otra Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General, Tokio 2004; y la última enmienda se llevó a cabo en la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, Octubre 2008. Actualmente está en consideración una nueva revisión a ser definida en el año 2014. La Declaración de Helsinki se fundamenta en los diez puntos del Código de Nüremberg y a ellos les suma la Declaración de Ginebra (1948); ésta última constituye un estatuto de deberes éticos para los médicos. La Declaración de Helsinki incluye treinta y cinco artículos, y una introducción. En ellos se formulan principios para toda investigación médica y también principios aplicables cuando la investigación médica se combina con la atención médica. Este documento consigna, como principio básico, el del respeto del sujeto y su derecho a tomar decisiones adecuadamente informadas.

Está organizada en tres ítems:

1) Introducción: se refiere, en forma general, a los principios éticos que deben orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigaciones en seres humanos; se trata de cuidar la salud del ser humano y -cuando se llevan a cabo investigaciones- éstas deben ser realizadas por personas científicamente cualificadas, que son las genuinas responsables del individuo sujeto a investigación. En esta introducción se establece claramente la prioridad del bienestar de los seres humanos aún antes que el bien de la sociedad y de la ciencia.

2) Principios básicos para toda investigación médica: formula el deber de proteger la vida y la dignidad del ser humano, como así también su intimidad. Se refiere al cuidado del medio ambiente; a la necesidad de protocolizar cualquier investigación, método o proyecto, que debe ser elaborado teniendo en cuenta una cuidadosa evaluación de riesgos y beneficios; la expectativa justificada de un beneficio para la población; y la necesidad de un adecuado consentimiento previo del sujeto participante que siempre intervendrá voluntariamente.

3) Principios aplicables cuando la investigación médica se combina con la atención médica: durante y después de la investigación, los sujetos han de contar con los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos disponibles; si no existieran disponibles, cualquier procedimiento nuevo debe de contar con el consentimiento informado del paciente.

Informe Belmont

En 1972 el mundo tomó conocimiento del llamado "estudio Tuskegee" llevado a cabo en Estados Unidos (en el valle de Tuskegee, en Alabama) entre los años 1932 y 1972. En esta investigación se dejó cruelmente librados a su suerte a cuatrocientos hombres de raza negra, de clase socio-económica baja, enfermos de sífilis, porque así lo establecían los requerimientos del diseño de la investigación que los incluía. Esto ocurrió a pesar de disponer de antibióticos para su tratamiento (la penicilina ya era el antibiótico de elección para la sífilis desde 1947). Como respuesta a la difusión pública de esta atrocidad, el Departamento de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos elaboró y dio a publicidad, en el año 1979, el llamado *Informe Belmont* en el que establecía los *Principios Éticos y pautas para la protección de los seres humanos en la investigación*. Este informe constituyó la iniciativa inicial en la formulación de los principios de *autonomía*, *beneficencia y justicia o equidad*. Además, por primera vez, se establecían claramente las diferencias entre práctica médica e investigación. Este

importante documento incluye tres puntos.

En el primer punto: *Límites entre la práctica y la investigación*, señala que, si bien eventualmente puede resultar difícil distinguir entre la investigación y la práctica ya que frecuentemente ocurren simultáneamente, el objetivo de la práctica médica o del comportamiento es el de establecer diagnósticos y dar tratamiento preventivo o terapéutico a ciertos individuos. El término "investigación" -en tanto- se refiere a una actividad diseñada para probar una hipótesis, obtener conclusiones, y por lo tanto, desarrollar o contribuir a un conocimiento general más amplio. La práctica asistencial médica debe ser controlada por los comités de ética de la práctica médica; en tanto que la investigación lo será por los comités de ética de la investigación. También señala este informe que ambas actividades pueden realizarse simultáneamente, sin que ello signifique confusión con respecto a la revisión requerida para cada actividad; y añade a continuación: la regla general es que si existe algún elemento de investigación en una actividad, esa actividad debe ser sometida a revisión para la protección de los seres humanos. Por nuestra parte nos parece importante señalar que, en lo que se refiere a este primer punto del Informe Belmont, es precisamente en el área de la Genética Médica donde frecuentemente se ejecutan simultáneamente prácticas e investigación médica. Aquí se señala claramente que ambas actividades simultáneas no son incompatibles en tanto y en cuanto los aspectos correspondientes a investigación sean protocolizados y aprobados por el o los comités correspondientes. El segundo punto: *Principios éticos básicos*, define cada uno de los tres principios fundamentales a ser tenidos en cuenta en investigaciones que involucran a sujetos humanos: se trata de los principios de respeto a las personas, de beneficencia y de justicia. El principio de *Respeto* o *Autonomía* incluye dos requisitos morales diferentes: el de reconocer la autonomía de aquellos que la tienen y el de proteger la autonomía de quienes no la tienen. En todos los casos debe existir voluntariedad e información previa. Según el principio de *Beneficencia*, no es suficiente con respetar la autonomía de las personas y no hacerles daño, sino que es requisito indispensable hacer esfuerzos para asegurar su bienestar. En este informe se consigna que el término *beneficencia* se refiere a menudo a actos de bondad o caridad que van más allá de la estricta obligación. En esta declaración, la beneficencia se entiende en un sentido más amplio, como una obligación. Con respecto al principio de *Justicia*, el documento comienza interrogándose sobre un punto trascendente: ¿La justicia se refiere a la justa distribución o a lo que es merecido? Hace, asimismo, una reflexión con respecto a la manera en que la gente debe ser tratada "igualmente". Comenta además que existen algunos criterios como experiencia, edad, nivel de privación, competencia, mérito y posición, que podrían ser válidos para una distribución no igualitaria; y que existen diversas formulaciones -en general ampliamente aceptadas-para una justa manera de repartir los beneficios y las obligaciones. El tercer punto del Informe se refiere a las *Aplicaciones* y específicamente al Consentimiento Informado (CI), la valoración de riesgos y beneficios, y la selección de sujetos. El Consentimiento Informado requiere: información, comprensión y voluntariedad. Con respecto a los riesgos expresa la necesidad de evitar ambigüedades; por su parte los beneficios se definen como un valor positivo para la salud o para el bienestar. De modo que la "valoración riesgos/beneficios" incluye las probabilidades y la magnitud de daños posibles y los beneficios anticipados. Con respecto a la selección de sujetos, expresa que así como el principio de Respeto se expresa en el Consentimiento Informado, es decir, en la libre voluntariedad; y el de Beneficencia en la evaluación de riesgos/beneficios, el principio de Justicia debe ser el rector moral de una equitativa selección de los sujetos para una investigación. Además, completa el concepto señalando que la justicia debe considerarse a dos niveles: el individual y el social; y se explaya sobre esta idea.

Conferencia Internacional de Armonización

En el año 1996 se llevó a cabo la *Conferencia Internacional de Armonización* (CIARM) sobre *Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para uso en Humanos.* Constituyen los Lineamientos para la *Buena Práctica Clínica* (BPC), desarrollados por el Grupo Experto de Trabajo de la Conferencia Internacional de Armonización, con representantes de la Unión Europea, Japón y EUA.

Convenio sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina

En 1997 se elaboró y dio a publicidad, en la ciudad de Oviedo, España, el *Convenio sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina*, aprobado y suscrito por representantes de veinte países, miembros del Consejo de Europa. También se lo conoce como *Declaración de Oviedo*. Consta de doce capítulos y treinta y un artículos e incorpora, en su capítulo IV, aspectos relativos al Genoma Humano y las intervenciones sobre el mismo. En el artículo primero específica que las partes -es decir los Estados- que suscriban el Convenio protegerán la dignidad de todo ser humano.

(Importa reflexionar respecto del significado del término "dignidad", sobre el que posiblemente no todo el mundo opine lo mismo.)

Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos

Pocos meses después, en noviembre de 1997, la *Conferencia General de UNESCO* proclamó la *Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos*, sobre la base de la *Declaración Universal de Derechos Humanos* del 10 de diciembre de 1948 y otros pactos internacionales.

Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica

En el año 2000 la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) elaboró y dio a conocer un documento denominado *Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica*. Se trata de un documento que establece un sistema de revisión ética con el objeto de propender a la protección de los potenciales participantes en investigaciones biomédicas y -asimismo- a contribuir a la más alta calidad posible en la ciencia y la ética de la investigación. Estas Guías complementan las leyes, reglas y prácticas existentes, y apuntan a servir de base a los procedimientos que los Comités de Ética deben llevar a cabo, según sus funciones. Establecen un estándar internacional que asegure la calidad en la revisión de los aspectos éticos de las investigaciones biomédicas. Además, las Guías, definen la constitución de los Comités de Ética, los requisitos para sus miembros, para las revisiones, decisiones, seguimiento, documentación y archivo de las actuaciones.

Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos

Preparadas por el *Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas* (CIOMS) en colaboración con la *Organización Mundial de la Salud*, se establecieron en el año 2002 las *Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos*. Este importante y extenso documento incluye veintiuna pautas y seis apéndices. Sin embargo, a nuestros fines debemos señalar que en él no se abordan algunas áreas de la investigación biomédica como las relacionadas con la genética humana, o la investigación en productos de la concepción como embriones, fetos y tejidos fetales.

Surveying and Evaluating Ethical Reviews Practices

Dos años después de la publicación de las Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica, la Organización Mundial de la Salud, elaboró este nuevo documento que complementa el anterior. El texto de *Surveying and Evaluating Ethical Review Practices* fue publicado en el año 2002.

Handbook of Good Clinical Research Practice

Ese mismo año -2002- también la *Organización Mundial de la Salud* dio a publicidad un nuevo documento: *Handbook of Good Clinical Research Practice*, con el propósito de complementar otro del año 1995: *Guidelines for good clinical practice* (GCP) *for trials on pharmaceutical products*. Se refiere a las disposiciones requeridas a las autoridades regulatorias, a los patrocinadores y a los investigadores, que realizan investigación clínica con patrocinio de la industria o de los gobiernos.

Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos

En octubre de 2003 la *Conferencia General de UNESCO* proclamó la *Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos*, documento en el cual elaboró un minucioso recorrido por los diversos aspectos en que el manejo de datos genéticos debe ser realizado de acuerdo a pautas bioéticas concretas.

Documento de las Américas

En marzo de 2005 se celebró, en la República Dominicana, la *IV Conferencia Panamericana para la Armonización de la Reglamentación Farmacéutica*. Allí se elaboró el *Documento sobre Buenas Prácticas Clínicas*, también conocido como *Documento de las Américas*, con la participación de representantes de Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, México, EUA y Venezuela. Consta de nueve capítulos y cinco anexos en los que se consignan normas para Ética de la Investigación.

Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos

En octubre de 2005, la *Conferencia General de UNESCO* proclamó por aclamación, en su 33° Reunión en París, la *Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos*. Esta Declaración se refiere a las cuestiones éticas relacionadas con la medicina, las ciencias de la vida y las tecnologías conexas aplicadas a los seres humanos, teniendo en cuenta

sus dimensiones sociales, jurídicas y ambientales.

Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells

En el año 2008, la *International Society for Stem Cells Research* (ISSCR), integrada por un grupo multidisciplinario de miembros de trece países, elaboró y publicó un documento denominado *Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells*, con el propósito de recomendar -desde los aspectos científicos, clínicos, regulatorios, éticos y sociales- el traslado responsable de investigación básica con células estaminales, hacia investigación clínica y eventualmente al tratamiento de pacientes. Los elementos de investigación a los que se refiere este documento son: productos de origen embrionario humano u otro tipo de células pluripotentes y, específicamente, las aplicaciones de células estaminales tanto adultas como embrionarias, y células hematopoyéticas o de otro tipo, más allá de los estándares habituales. Enfoca sus recomendaciones hacia tres aspectos específicos: el procesamiento celular, los estudios preclínicos y la investigación clínica.

Comité de Ética. Procedimientos Normalizados de Trabajo para Presentar Propuestas de Investigación

La *Organización Panamericana de la Salud* (OPS) elaboró, en el año 2009, este documento denominado: *Comité de Ética. Procedimientos Normalizados de Trabajo para Presentar Propuestas de Investigación*, en el que se refiere a aspectos específicos de las propuestas de investigación. Habla del proceso de presentación de las mismas, de su evaluación, de la supervisión y seguimiento; de las consideraciones especiales para poblaciones vulnerables; de las características de los miembros integrantes de comités de ética y de algunos modelos de formularios como, por ejemplo, el del consentimiento informado, entre otros puntos.

International Ethical Guidelines for Epidemiological Studies

Este documento, preparado y dado a publicidad por la *Organización Mundial de la Salud* y el *Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas* en el año 2009, se refiere específicamente a los aspectos éticos en investigación epidemiológica. Consta de veinticuatro ítems exhaustivamente comentados y cinco apéndices. El punto vigésimo cuarto se refiere al uso de muestras biológicas archivadas y de los datos relacionados con las mismas.

REGULACIONES BIOÉTICAS EN LA REPÚBLICA ARGENTINA: LEYES, RESOLUCIONES Y DISPOSICIONES

En el orden nacional, la República Argentina ha adherido a los documentos internacionales que regulan las nuevas tecnologías en investigaciones que involucran a seres humanos, según consta en la Resolución 1480/ 2011 del Ministerio de Salud de la Nación.

Resolución 1480/2011 del Ministerio de Salud de la Nación. Guía para Investigaciones con Seres Humanos

Se trata de una Resolución que modifica y amplía la anterior 1490/07 (Guía de las Buenas Prácticas de Investigación Clínica en Seres Humanos. Anexo I), mediante la cual se establecen las pautas éticas y operativas que deben regir, dentro del ámbito nacional, cuando se realizan investigaciones con seres humanos. Se basa en las últimas versiones actualizadas de los siguientes documentos internacionales: la Declaración de Helsinki (AMM, 2008), las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos (CIOMS, 2002), la International Ethics Guidelines for Epidemiological Studies (CIOMS, 2009), la Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells (ISSCR, 2008), las Guías Operativas para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica (OMS, 2000), el documento Surveying and Evaluating Ethical Review Practices (OMS, 2002 a), los Lineamientos para la Buena Práctica Clínica (ICH, 1996), el Handbook for Good Clinical Research Practice (OMS, 2002 b), el Documento de las Américas sobre Buenas Prácticas Clínicas (OPS, 2005), el documento Comité de Ética. Procedimientos Normalizados de Trabajo (OPS, 2009), la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (UNESCO, 1997), la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (UNESCO, 2003), y la Declaración Internacional sobre Bioética y Derechos Humanos (UNESCO, 2005). Se trata de principios y normas a los que la República Argentina ha adherido y son, por lo tanto, de cumplimiento obligatorio.

Ley 3301/09. Legislatura de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Protección de Derechos de Sujetos de Investigación en Salud

Esta Ley, que rige en el ámbito de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), adopta como principios generales de las investigaciones con seres humanos las siguientes regulaciones: la Declaración de Helsinki (versión 2008), las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos (CIOMS, 2002), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (UNESCO, 2005), el Documento de las Américas sobre Buenas Prácticas Clínicas (OPS, 2005), las Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica (OMS, 2000), la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (UNESCO, 1997), la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (UNESCO, 2003) y la Guía de las Buenas Prácticas de Investigación Clínica en Seres Humanos, ANEXO I de la Resolución 1490/2007 del Ministerio de Salud de la Nación.

En este documento se establece la creación de un Comité Central de Ética en Investigaciones (CEC) que deberá llevar -entre otras funciones- el registro y evaluación de los Comités de Ética en Investigaciones, tanto de carácter público como privado, en el ámbito de la Ciudad. Cabe acotar que el CEC de la CABA tiene facultad para acreditar o no acreditar a los Comités de Ética en Investigaciones, y a cada uno de sus miembros integrantes, según los antecedentes, la idoneidad y los conocimientos que éstos demuestren poseer, para el ejercicio de su tarea en la evaluación de protocolos y seguimiento del curso de los trabajos de investigación.

Ley 11044/09 y Decreto Reglamentario 3385. Departamento de Salud, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires

Esta Ley, de aplicación en los sub-sectores públicos, en Obras Sociales y Privadas, de la Provincia de Buenos Aires, establece las normas que rigen para las investigaciones que involucran a seres humanos, incluyendo los eventuales efectos nocivos del medio ambiente sobre las personas, y los métodos y técnicas de aplicación en la atención de la salud humana.

En esta normativa se especifica que, en la Provincia de Buenos Aires, las investigaciones que involucren a seres humanos deben ajustarse a los principios éticos universalmente proclamados. Señala sus fundamentos en las pautas exigidas por las Guías de Buena Práctica Clínica y su Armonización Internacional, en el Código de Nüremberg, en la Declaración Helsinki, en las recomendaciones del Consejo de las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas y de la Organización Mundial de la Salud, en el Documento de las Américas de la Organización Panamericana de la Salud, en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos y en la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de UNESCO, en las Reglas Éticas para la Investigación en Países Subdesarrollados del Nuffield Council on Bioethics (Gran Bretaña, 2002), y por las normas que las sustituyan o actualicen.

Disposición ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) N° 6677/2010

Se refiere a: "…*Apruébase el Régimen de Buena Práctica Clínica para Estudios de Farmacología Clínica*".

Disposición ANMAT N° 6550/2010

Se refiere a: "…*Constancia fehaciente de la comunicación efectuada ante la máxima autoridad Sanitaria Jurisdiccional, según el lugar donde se encuentren el/los centros sanitarios propuestos, de la tramitación ante la ANMAT del pedido de la autorización para la realización de un ensayo clínico*".

Disposición ANMAT N° 4457/2010

Se refiere a: "…*Solicitud de autorización para la inscripción en el Registro de Productores y Productos de Tecnología médica*".

Disposición ANMAT N° 5330/1997 (con las modificaciones de las Disposición ANMAT Nº 690/2005 y 2124/2005)

Se refiere a: "…*Apruébase el nuevo texto ordenado del Régimen de Buenas Prácticas de Investigación en Estudios de Farmacología Clínica. Modificación de la Disposición Nº 4854/1996*".

ADDENDUM

Existen, además de las reseñadas, normativas provinciales y de jurisdicciones menores, cuyo cumplimiento es de carácter obligatorio. Por otra parte, es necesario conocer que la legislación señalada precedentemente no agota el marco regulatorio en bioética. Otros aspectos, como por ejemplo los concernientes al manejo de los animales de laboratorio, o las disposiciones relativas a la producción, patentamiento y comercialización de organismos genéticamente modificados (OGM) y su importancia para la salud humana y para el medio ambiente, han sido objeto de otras regulaciones cuyo tratamiento excedería los límites del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

CIOMS (2002). Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos. En: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/pautas_eticas_internacionales.htm (Fecha de consulta: noviembre 2004)

CIOMS (2009). International Ethics Guidelines for Epidemiological Studies. En: www.ufrgs.br/bioetica/cioms2008.pdf . (Fecha de consulta: marzo 2010).

ICH (1996). Lineamientos para la Buena Práctica Clínica. En: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073128.pdf (Fecha de consulta: abril 2006).

ISSCR (2008). Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells. En: www.isscr.org/home/publications/ClinTransGuide (Fecha de consulta: abril 2010).

OMS (2000). Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Investigación Biomédica. En: http://www.bioeticaunbosque.edu.co/Articulos/Documentos/Comites%20de%20etoca%20inv.% 20OMS.pdf (Fecha de consulta: septiembre 2009).

OMS (2002a). Surveying and Evaluating Ethical Review Practices. En: digicollection.org/hss/es/d/Js4951e/6.2.html (Fecha de consulta: mayo 2012) OMS (2002b). Handbook for Good Clinical Research Practice. En: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/gcp1.pdf (Fecha de consulta: octubre 2012)

OPS (2005). Documento de las Américas sobre Buenas Prácticas Clínicas. En: www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/ivconf_bpc-propuesta-esp.doc (Fecha de consulta: marzo 2010)

OPS (2009). Comité de Ética. Procedimientos Normalizados de Trabajo. En: new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/074_SPAN.pdf (Fecha de consulta: marzo 2010)

Potter V.R. (1971) Bioethics: Bridge to the Future. Englewood Cliffs. Prentice Hall. New Jersey.

Real Academia Española (1992) Diccionario de la Lengua Española. Vigésima Primera Edición. Editorial Espasa Calpe S.A. Madrid, España.

Reich W.T. (1978) Encyclopedia of bioethics, Vol I, XIX. The Free Press. New York. UNESCO (1997). Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos. En: portal.unesco.org/.../ev.php-URL_ID=13177&URL_DO=DO_TOPIC...(Fecha de consulta: mayo 2007).

UNESCO (2003). Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos. En: portal.unesco.org/.../ev.php-URL_ID=17720&URL_DO=DO_TOPIC...(Fecha de consulta: mayo 2007).

UNESCO (2005). Declaración Internacional sobre Bioética y Derechos Humanos. En: unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180S.pdf (Fecha de consulta: marzo 2009)

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Everly Conway y al Dr. Alberto Macario, del IMET, School of Medicine, University of Maryland, USA, por sus aportes al manuscrito original.

BAG
Journal of Basic & A pplied Genetic s

MAPEO DE QTL PARA RESISTENCIA A MAL DE RÍO CUARTO EN MAÍZ

Di Renzo M.A., Bonamico N.C.

Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto
(Código Postal X5804BYA, 5800 Río Cuarto, Córdoba)

mdirenzo@ayv.unrc.edu.ar

ABSTRACT

Mal de Río Cuarto (MRC) is the most important disease of maize. It is endemic in certain areas of Argentina, and produced by a vector identified as Mal de Río Cuarto virus (MRCV), genus *Fijivirus*, Family *Reoviridae*. Initial studies showed that resistance to MRCV is an oligogenic trait with moderate to low heritability, governed by nuclear genes with dominant and additive effects. Genotypes usually have unpredictable responses because this viral disease, which occurs unsystematically, has a marked genotype-environment interaction. QTL mapping for MRCV reaction allowed the determination of number and individual effects of the *loci* involved and the estimation of interactions among these genes and with the environment. Results obtained with different mapping populations, genetic backgrounds and methods of statistical analysis indicate that QTLs are located in the same regions where loci of resistance to other pathogens are grouped into clusters. QTLs for reaction to MRCV are located in chromosomes 1, 3, 4, 6, 8, and 10, and account for 6–42 % of the phenotypic variation depending on populations, environments and methods of analysis. In particular, QTLs of bins 1.02/3, 8.02/3 and 10.02/4 could be considered promising for detecting candidate genes related to this viral disease. Additional studies will allow their use in breeding, germplasm conservation and genomic analysis.

Key words: Molecular markers, quantitative trait loci, viral disease, MRCV.

RESUMEN

La enfermedad más importante del maíz en la Argentina es el Mal de Río Cuarto (MRC). Producida por el virus identificado como Mal de Río Cuarto virus (MRCV) género *Fijivirus*, Familia *Reoviridae*, es una enfermedad endémica de la región central de Argentina. Estudios iniciales mostraron que la resistencia al MRCV es un carácter oligogénico de moderada a baja heredabilidad, regido por genes nucleares con efectos aditivos y dominantes. Los genotipos usualmente tienen respuestas impredecibles porque esta enfermedad virósica, que se presenta de manera no sistemática, manifiesta una marcada interacción genotipo-ambiente. El mapeo de QTL para la reacción al MRCV permitió determinar el número y el efecto individual de *loci* involucrados y estimar las interacciones entre estos genes y de ellos con el ambiente. Los resultados obtenidos con diferentes poblaciones de mapeo, fondos genéticos y métodos de análisis estadísticos indican que los QTL identificados en la mayoría de los ambientes de evaluación se ubican en las mismas regiones cromosómicas en las que se han detectado *loci* de resistencia a otros patógenos agrupados en racimo (*cluster*). Los QTL para reacción a MRCV están ubicados en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 8 y 10, los cuales explican entre 6 y 42 % de la variación fenotípica según las poblaciones, los ambientes y los métodos de análisis. En particular, los QTL de los *bins* 1.02/3, 8.02/3 y 10.02/4 podrían considerarse promisorios para detectar genes candidatos relacionados con esta enfermedad virósica. Estudios adicionales permitirán su utilización en mejoramiento genético, conservación de germoplasma y análisis genómico.

Palabras clave: Marcadores moleculares, loci de caracteres cuantitativos, enfermedad viral, MRCV.

El inminente cambio climático favorecerá la propagación y el aumento poblacional de los insectos vectores de virus que causan enfermedades en plantas, por lo que en el futuro, éstas podrían incrementarse (Hogenhout *et al.*, 2008). En los últimos años en las regiones templadas los inviernos han sido más cálidos y coincidentemente varios cultivos han presentado mayores problemas asociados con enfermedades transmitidas por insectos vectores. En un clima cada vez más inestable, la acumulación y la combinación de genes de resistencia que provienen de diversas fuentes de germoplasma brindarán soluciones de mayor durabilidad a los problemas de resistencia a enfermedades (Lucas, 2010).

La patología más importante del maíz en Argentina, debido a su severidad, incidencia y creciente difusión del área afectada, es el Mal de Río Cuarto (MRC) (Redinbaugh y Pratt, 2009). El *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) como agente causal pertenece al género *Fijivirus*, Familia *Reoviridae* (Distéfano *et al.*, 2002) y su transmisión natural se realiza por medio del insecto vector *Delphacodes kuscheli* (Ornaghi *et al.*, 1993) en forma persistente, circulativa y propagativa. El síntoma característico y distintivo del MRC lo constituye la proliferación de tejidos o enaciones sobre las nervaduras en el envés de las hojas (March *et al.*, 1995). En años de gran intensidad se han registrado lotes con pérdidas en los rendimientos superiores a 70 % (Rodriguez Pardina *et al.*, 1998).

Los progresos en el mejoramiento para lograr genotipos resistentes a la acción del MRCV mediante el uso de métodos tradicionales pueden ser lentos y costosos debido al fuerte efecto ambiental y a la escasa disponibilidad de fuentes de resistencia. Estudios iniciales sobre genética cuantitativa básica, muestran que la resistencia a MRC no está influenciada por herencia extracromosómica y que los efectos genéticos son de tipo aditivo y de dominancia parcial (Presello *et al.*, 1995; Di Renzo *et al.*, 2002; Di Renzo *et al.*, 2004; Kreff *et al.*, 2006). Resultados obtenidos con una generación temprana $F_{2:3}$ (Di Renzo *et al.*, 2002; Kreff *et al.*, 2006) y con líneas endocriadas recombinantes (RIL) derivadas de varias generaciones de autofecundación $F_{2:6}$ (Bonamico *et al.*, 2012) revelaron que la resistencia a MRC es un carácter de herencia oligogénica de moderada a baja heredabilidad. Cuando se utilizó una generación temprana $F_{2:3}$ evaluada fenotípicamente bajo condiciones de transmisión natural en Bulnes 1999, Sampacho 1999 y Sampacho 2000, el valor de heredabilidad estimado a través de ambientes fue de 0,44 (Di Renzo *et al.*, 2002). En cambio, en la población de RIL evaluada bajo condiciones semejantes en Río Cuarto en 2005 y 2006, y en Sampacho en 2004 y 2005, los valores de heredabilidad a través de los cuatro ambientes fluctuaron entre 0,20 y 0,27 según la variable utilizada. La intensidad de la reacción a MRCV también se expresó en términos de BLUPs (*Best Linear Unbiaset Prediction*) en el contexto de los modelos mixtos (Bonamico *et al.*, 2012).

Si bien la enfermedad se presenta de manera no sistemática ya que para su desarrollo requiere de la interacción entre un vector competente, un patógeno virulento, un hospedante susceptible y un ambiente favorable (Redinbaugh y Pratt, 2009; Lucas, 2010), los genotipos mostraron una respuesta impredecible evidenciada por la significativa interacción genotipo-ambiente y la baja correlación entre datos provenientes de diferentes ambientes.

En general en las descendencias provenientes de cruzamientos biparentales se observó que algunos genotipos presentaron mayor reacción al MRCV que el padre susceptible y otros menor que el tolerante. Es posible que esta moderada segregación transgresiva se deba tanto a efectos genéticos como a efectos ambientales o a errores experimentales (Di Renzo *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2012).

Estudios posteriores, en los que además del fenotipo relacionado con la reacción al MRCV se utilizaron polimorfismos moleculares, permitieron ubicar regiones cromosómicas responsables de la expresión de *loci* involucrados en la resistencia a MRCV.

Una forma básica y preliminar de mapeo de QTL para reacción a MRCV consistió en comparar las medias de los genotipos moleculares provenientes de descendencias de cruzamientos biparentales. Utilizando los genotipos de los marcadores para definir los niveles del factor tratamiento, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada marcador individual y se probó la asociación marcador-carácter mediante pruebas F (Di Renzo *et al.*, 2004; Faricelli, 2004). El análisis de la varianza permitió identificar marcadores SSR ubicados en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 8 y 10 asociados significativamente ($p<0.05$) con la variación observada en la reacción al MRCV.

Una limitante del ANOVA consiste en que tanto un QTL muy ligado con un efecto moderado como un QTL débilmente ligado con un efecto mayor producen efectos similares en la asociación marcador-carácter. Las limitaciones del análisis de marcadores individuales son superadas mediante la utilización de la información provista por mapas de ligamiento. El mapeo de QTL mediante modelos

estadísticos adecuados busca determinar el número y el efecto individual de los *loci* que regulan caracteres complejos y estimar las interacciones entre estos genes y de ellos con el ambiente (Xu, 2010). La estrategia predominante para la construcción de mapas de ligamiento en plantas ha sido la utilización de poblaciones de mapeo previamente diseñadas y, por lo tanto, de estructura genética conocida. Para el mapeo de QTL asociados a resistencia a MRC en maíz se analizaron poblaciones segregantes provenientes de cruzamientos biparentales (F_2, RIL y NIL). Estas poblaciones son ampliamente utilizadas para el mapeo de caracteres de interés en distintos programas de mejoramiento (Xu, 2010).

Mediante la estrategia llamada mapeo por intervalo (IM) (Lander y Botstein, 1989) la presencia de un QTL es evaluada a intervalos regulares sobre el mapa de ligamiento. Los marcadores flanqueantes pueden ser utilizados para inferir probabilidades condicionales para los genotipos de los QTL dado los genotipos de los marcadores flanqueantes y la frecuencia de recombinación entre los QTL y los marcadores. Con este método de análisis y utilizando una población de RIL, fueron identificados dos QTL ubicados en el cromosoma 1 (bin 1.01) y 4 (bin 4.08), que explicaron entre 8 y 10 % de la variación fenotípica en la reacción al MRCV (Bonamico *et al.*, 2012). Mediante el IM y genotipado selectivo, utilizando una población de $F_{2:3}$ con un fondo genético diferente al del estudio anteriormente mencionado, Borghi (2012) identificó tres QTL para resistencia al MRCV, ubicados en el cromosoma 1 (*bin* 1.01 y 1.07) y 10 (*bin* 10.04/5), que explicaron entre 28 y 42 % de la variación fenotípica.

Mejoras al mapeo por intervalo propuestas por Jansen y Stam (1994) y Zeng (1994) combinan la regresión múltiple y el mapeo por intervalo simple. La estrategia llamada mapeo por intervalo compuesto (CIM) mejora la precisión y el poder del análisis de los QTL introduciendo marcadores como cofactores (covariables) para controlar la variación genética debido a la segregación de QTL en otras partes del genoma. Utilizando este método, Di Renzo *et al.* (2004) identificaron dos QTL ubicados en el cromosoma 1 (*bin* 1.03) y 8 (*bin* 8.03/4), que explicaron simultáneamente 36,2 % de la variación fenotípica en la reacción al MRCV. Mediante el método de mapeo por intervalo compuesto, Bonamico *et al.* (2012) informaron la existencia de cuatro QTL que explicaron entre 6 y 14 % de la variación fenotípica en la reacción al MRCV, la cual se cuantificó por medio de las variables incidencia y severidad de enfermedad. Estos QTL, que se localizaron en los cromosomas 1 (*bins* 1.01 y 1.06), 4 (*bin* 4.08) y 10 (*bin* 10.02), explicaron entre 6 y 14 % de la variación fenotípica observada. Resultados recientes obtenidos con una población $F_{2:3}$, proveniente de un cruzamiento con fondo genético distinto al utilizado en los experimentos anteriores, y empleando también el CIM como metodología de análisis junto con genotipado selectivo, indicaron tres QTL para resistencia a MRC en los cromosomas 1 (*bins* 1.03 y 1.07) y 10 (*bin* 10.03/4), que explican entre 13 y 32 % de la variación fenotípica (Borghi, 2012). Kreff (2009) trabajó con dos poblaciones segregantes provenientes de cruzamientos biparentales con fondos genéticos distintos a los utilizados por Bonamico *et al.* (2012) y Borghi (2012) y mediante el método de mapeo por intervalo compuesto identificó marcadores tipo SSR y SNP asociados significativamente con resistencia a MRC en los cromosomas 2 y 5.

En coincidencia con numerosos trabajos de mapeo de QTL para resistencia a virosis en plantas en los que los alelos favorables provienen de ambos progenitores (Carson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008), nuestros resultados muestran que el progenitor susceptible aportó alelos favorables que aumentan la resistencia en muchos de los QTL identificados (Bonamico *et al.*, 2012; Borghi, 2012; Di Renzo *et al.*, 2004), lo cual apoya el origen genético de los fenotipos transgresivos.

Otro método utilizado para ubicar regiones cromosómicas responsables de la expresión de *loci* involucrados en la resistencia a MRC, fue el análisis discriminante discreto (AD) (Zhang *et al.*, 2005). La evaluación fenotípica se realizó en una población de RIL en seis ambientes pertenecientes a la zona central de la Argentina, en donde la enfermedad es endémica. Esta metodología de análisis permitió identificar marcadores SSR pertenecientes a los cromosomas 1, 2, 6 y 8 significativamente asociados con grado de severidad y otros caracteres relacionados a síntomas de la enfermedad MRC (Bonamico *et al.*, 2010).

Otra estrategia para el mapeo de QTL es el mapeo de asociación o desequilibrio de ligamiento (LD) que consiste en utilizar poblaciones que no provienen de cruzamientos específicos previamente diseñados, por lo que la estructura genética es desconocida (Flint-García *et al.*, 2003). Mediante la aplicación de este método y el uso de una población de NIL de maíz, Kreff (2009) identificó marcadores asociados significativamente con resistencia a MRC en el cromosoma 2. Actualmente se están analizando, mediante mapeo por asociación, datos moleculares (SNP) y fenotí-

picos relacionados con resistencia a MRC procedentes de una colección de líneas de introgresión de teosinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*) cedida por la Dra. Flint-García (Dallo *et al*., 2012).

Numerosas investigaciones describen la existencia de regiones cromosómicas en las que los *loci* de resistencia a patógenos se agrupan en *cluster* sobre algunos cromosomas en lugar de estar distribuidos al azar. Así, en el genoma del maíz, Wisser *et al*. (2006) informaron la presencia de dos *clusters* en los cromosomas 1 y 3, respectivamente; y de un *cluster* en cada uno de los cromosomas 2, 4, 5 y 10. Redinbaugh y Pratt (2009) señalaron cuatro *clusters* en los cromosomas 1, 3, 6 y 10. Con anterioridad, McMullen y Simcox (1995) mencionaron dos *clusters* de genes de resistencia a virus en los cromosomas 1 y 6. Para la reacción al MRCV los resultados obtenidos con diferentes poblaciones de mapeo, diferentes fondos genéticos y métodos de análisis estadísticos, sugirieron que los QTL asociados con la resistencia a la enfermedad MRC en la mayoría de los ambientes de evaluación, están ubicados en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 8 y 10 (Bonamico, 2010; Bonamico *et al*., 2012; Borghi, 2012; Di Renzo *et al*., 2004; Kreff *et al*., 2006), lo cual sugiere que las regiones cromosómicas identificadas se hallan involucradas en la resistencia a otras enfermedades de maíz. Particularmente los QTL cuyas posiciones corresponden a los *bins* 1.02/3, 8.02/3 y 10.02/4 y que fueron ampliamente identificados, podrían considerarse promisorios para la detección de genes candidatos relacionados con esta enfermedad virósica (Tabla 1).

El alto costo y la inestabilidad de los QTL frente a distintas condiciones ambientales han sido un obstáculo importante para la adopción de la selección asistida por marcadores (MAS) en el mejoramiento genético de algunas especies vegetales (Collard y Mackill, 2008). La reacción al MRCV está fuertemente afectada por el ambiente de crecimiento. Bonamico *et al*. (2012) informaron que algunos QTL presentaron comportamiento inestable aunque la interacción QTLxE contribuyó poco a la variabilidad total. La presencia de QTL específicos de ambiente, aunque no son los de mayor interés, pueden ser de valor para mejorar la productividad si se consideran características ambientales particulares (Paterson *et al*., 1991).

Los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de programas eficientes de mejoramiento genético para resistencia a MRC en maíz, especie vegetal de interés regional y nacional. Las investigaciones realizadas han generado conocimientos teóricos y prácticos favorables para la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en la reacción a la infección del MRCV. Estudios adicionales permitirían utilizar estos QTL para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento mediante la selección (MAS) y retrocruza (MAB) asistida por marcadores, como así también en la conservación de germoplasma y en técnicas genómicas.

Tabla 1. Identificación de QTL y marcadores moleculares asociados con la reacción al virus Mal de Río Cuarto.

[1]ISE = Índice de severidad de enfermedad.
[2]SIM = Mapeo por intervalo simple; CIM= Mapeo por intervalo compuesto; ANOVA= Análisis de la varianza; AD= Análisis discriminante discreto.

Progenitor Susceptible	Progenitor Resistente	Población de Mapeo	Carácter	*Loci* de Resistencia	Cromosoma (*BIN*)	Método de Análisis[2]	Referencia Bibliográfica
Mo17	BLS14	$F_{2:3}$	ISE	Dos QTL	1 (1.03), 8 (8.03-4)	CIM	Di Renzo *et al.* (2004)
				Siete SSR	1 (1.03, 1.04), 8 (8.02, 8.06)	ANOVA	
–	–	$F_{2:3}$	Síntomas de MRC	Cinco QTL	1 (1.02-03, 1.07-08), 4 (4.05-7), 8 (8.02), 10 (10.04-5)	CIM	Kreff *et al.* (2006)
–	–	RIL NIL	GRADO	SSR SNP	2, 5 2, 5	CIM LD	Kreff (2009)
Mo17	BLS14	RIL	ISE	Siete QTL	1 (1.03, 1.06), 4 (4.03, 4.05), 6 (6.02), 8 (8.03), 10 (10.02)	SIM/CIM	Bonamico *et al.* (2010)
Mo17	BLS14	RIL	Síntomas de MRC y severidad	Ocho SSR	1 (1.02, 1.06), 2 (2.06), 6 (6.02), 8 (8.08)	AD	Bonamico *et al.* (2010)
Mo17	BLS14	RIL	Incidencia y severidad	Cuatro QTL	1 (1.01, 1.06), 4 (4.08), 10 (10.02)	SIM/CIM	Bonamico *et al.* (2012)
B73	LP116	$F_{2:3}$	ISE	Tres QTL	1 (1.03, 1.07), 10 (10.04)	SIM/CIM	Borghi (2012)

BIBLIOGRAFÍA

Bonamico N. (2010) Mapeo de QTL en líneas endocriadas recombinantes de maíz: Regiones del genoma que confieren tolerancia a Mal de Río Cuarto. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba.

Bonamico N.C., Balzarini M.G., Arroyo A.T., Ibañez M.A., Díaz D.G., Salerno J.C., Di Renzo M.A. (2010) Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. PHYTON 79: 31-38.

Bonamico N.C., Di Renzo M.A., Ibañez M.A., Borghi M.L., Díaz D.G., Salerno J.C. (2012) QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using a RIL population. J. Agr. Sci. 150 (5): 619-629. (CJO doi: 10.1017/ S0021859611000943).

Borghi M.L. (2012) Identificación de QTL ligados a resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé.

Carson M.L., Stuber C.W., Senior M.L. (2004) Identification and mapping of quantitative trait loci conditioning resistance to Southern Leaf Blight of maize caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O. Phytopathology 94 (8): 862-867.

Collard B.C.Y., Mackill D.J. (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Phil. Trans. R. Soc. B. 363: 557-572.

Dallo M., Flint-Garcia S., Peña Malavera A., Balzarini M., Di Renzo M. (2012) Buscando estructura poblacional en líneas de introgresión de maíz. X Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística (CLATSE), 16-19 octubre 2012, Córdoba, Argentina.

Di Renzo M.A., Bonamico N.C., Díaz D.D., Salerno J.C., Ibañez M.A., Gesumaría J.J. (2002) Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). J. Agr. Sci. 139: 47-53.

Di Renzo M.A., Bonamico N.C., Díaz D.D., Ibañez M.A., Faricelli M.E., Balzarini M.G., Salerno J.C. (2004) Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea m*ays L. J. Agr. Sci. 142: 289-295.

Distéfano A.J., Conci L.R., Muñoz Hidalgo M., Guzmán F.A., Hopp H.E., Del Vas M. (2002) Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV): evidence that the virus should be a separate Fijivirus species. Arch. Virol. 147: 1699-1709.

Faricelli M.E. (2004) Marcadores moleculares en *Zea mays* (L.) asociados a tolerancia al Mal de Río Cuarto. Trabajo final de Grado Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba.

Flint-García S.A., Thornsberry J.M., Buckler E.S. (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. Ann. Rev. Plant Biol. 54: 357-374.

Hogenhout S.A., El-Desouky A., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G. (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 46: 327-359.

Jansen R.C., Stam P. (1994) High resolution of quantitative traits into multiple *loci* via interval mapping. Genetics 136: 1447-1455.

Kreff E.D., Pacheco M.G., Díaz D.G., Robredo C.G., Puecher D., Céliz A., Salerno J.C. (2006) Resistance to *Mal de Río Cuarto Virus* in maize: A QTL Analysis. J. Basic Appl. Genet. 17: 41-50.

Kreff E.D. (2009) Genómica aplicada al mapeo preciso de genes de resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Tesis Doctorado, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé.

Lander E.S., Botstein D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.

Li X.H., Wang Z.H., Gao S.R., Shi H.L., Zhang S.H., George M.L.C., Li M.S., Xie C.X. (2008) Analysis of QTL for resistance to head smut (*Sporisorium reiliana*) in maize. Field Crops Res. 106: 148-155.

Lucas J.A. (2010) Advances in plant disease and pest management. J. Agr. Sci. 149: 91-114.

March G.J., Balzarini M., Ornaghi J.A., Beviacqua J.E., Marinelli A. (1995) Predictive model for "Mal de Río Cuarto" disease intensity. Plant Dis. 79: 1051-1053.

McMullen M.D., Simcox K.D. (1995) Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. Mol. Plant. Microbe. 8: 811-815.

Ornaghi J.A., Boito G., Sanchez G., March G., Beviacqua J. (1993) Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. J. Gen. Breed. 47: 277-282.

Paterson A.H., Damon S., Hewitt J.D., Zamir D., Rabinowitch H.D., Lincoln S.E., Lander E.S., Tanksley S.D. (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. Genetics 127: 181-197.

Presello D., Céliz A., Frutos E. (1995) Efectos genéticos asociados con la resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en líneas endocriadas de maíz. In: Avila L.G., Céspedes L.M. (Eds.) Proceedings of III Latin American and XVI Andean Zone of Maize Researchers Meeting. Tomo I. Fundación Patiño SI. Bolivia. pp. 407-413.

Redinbaugh M.G., Pratt R.C. (2009) Virus Resistance. In: Bennetzen J.L., Hake S.C. (Eds.) Handbook of Maite: Its Biology. Springer-Verlag, New York, pp. 251-270.

Rodriguez Pardina P.E., Giménez Pecci M.P., Laguna I.G., Dagoberto E., Truol G. (1998) Wheat: A new natural host for the Mal de Río Cuarto virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. Plant Dis. 82: 149-152.

Wisser R.J., Balint-Kurti P.J., Nelson R.J. (2006) The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. Mini-Review. Phytopathology 96: 120-129.

Xu Y. (2010) Molecular plant breeding. 1st edition. London, UK: CAB International, Wallingford.

Zeng Z.B. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457-1468.

Zhang N., Xu Y., Akash M., McCouch S., Oard J.H. (2005) Identification of candidate markers associated with agronomic traits in rice using discriminant analysis. Theor. Appl. Genet. 110: 721-729.

AGRADECIMIENTOS

El estudio de la forma de herencia de la resistencia y la identificación de QTL (*quantitative trait loci*) asociados con la reacción al MRCV constituye una línea de investigación de nuestro grupo de trabajo, que ha sido desarrollada en forma conjunta con investigadores del INTA Castelar y Pergamino en el marco de distintos proyectos de investigación (FONCyT, SECYT UNRC y Agencia Córdoba Ciencia S.E.), y de un convenio de vinculación institucional y tecnológico INTA-UNRC. Así mismo se trabajó conjuntamente con investigadores de la cátedra de Estadística y Biometría de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC.

BAG
Journal of Basic & A pplied Genetic s

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS* L.) MEDIANTE SSR

Randazzo C.P.[1], Rosso B.S.[2], Pagano E.M.[1]

[1]Instituto de Genética "Ewald A. Favret" INTA Castelar.
[2]EEA INTA Pergamino.

epagano@cnia.inta.gov.ar

ABSTRACT

White clover (*Trifolium repens* L.) is a forage legume of high nutritive value. It is a very efficient species for nitrogen soil fixation through symbiosis. In Argentina, it has widely spread in humid and sub-humid regions. The aim of this work was to evaluate SSR molecular markers for genetic differentiation and identification of white clover cultivars. Relationships among cultivars were established and cultivars were grouped on the basis of molecular markers and morpho-agronomic characters . Twenty- four white clover cultivars and two red clover cultivars from different origins were evaluated. Fifteen SSR fluorescence markers were employed. PCR products were separated using ABI PRISM 3100 genetic analyzer. A total of 114 amplification products were obtained, with 99 % polymorphism. Average number of bands per SSR was 8.66. Cultivar similarity ranged from 15 % to 85 % , being Haifa and Zapicán the most similar. Cultivars from New Zealand were genetically more distant, with similarity values lower than 50 %. Correlation between morphological and genetic matrixes was significant (r= 0.48). All cultivars clustered in three groups, following a pattern which corresponded mainly to white clover leaflet type.

Key words: molecular markers, microsatellites, white clover, cultivars.

RESUMEN

El trébol blanco (*Trifolium repens* L) es una leguminosa forrajera de gran valor nutritivo y muy eficiente en la incorporación de nitrógeno (N) al suelo mediante fijación simbiótica. En Argentina se ha difundido ampliamente en las regiones húmeda y subhúmeda. Los objetivos del presente trabajo fueron i) detectar la capacidad de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para la diferenciación genética e identificación de cultivares de trébol blanco y ii) determinar la relación entre los agrupamientos de los cultivares basados en marcadores moleculares y caracteres agronómicos. Se analizaron 24 cultivares de trébol blanco y dos de trébol rojo de diversos orígenes. Se utilizaron 15 SSR marcados con fluorescencia. Los productos de PCR fueron separados en analizador genético ABI PRISM 3100. Se obtuvieron un total de 114 productos de amplificación, con 99 % de polimorfismo. El promedio de bandas por SSR fue de 8,66. En el dendograma obtenido de la clasificación de los 24 cultivares de trébol blanco se observó que los cultivares se distribuyen entre un 15 % y 85 % de similitud. Los cultivares de origen neozelandés fueron genéticamente los más distantes, con valores de similitud inferiores a 50 %. La correlación de matrices morfológica y genética fue significativa (r= 0,48). Los 15 cultivares de trébol blanco se clasificaron en tres grupos, que correspondieron principalmente a los tipos de trébol según el tamaño de folíolo.

Palabras clave: marcadores moleculares, microsatélites, trébol blanco, cultivares.

INTRODUCCIÓN

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa forrajera perenne que se utiliza como componente de las pasturas cultivadas en las regiones de clima templado de muchos países del mundo, y es la especie de mayor importancia agronómica entre las casi 300 especies del género *Trifolium*. Es nativa del Mediterráneo; en Argentina está naturalizada y se ha propagado ampliamente en la región pampeana húmeda y subhúmeda.

Es una especie de polinización cruzada, con un número cromosómico de 2n= 4x =32, de naturaleza alotetraploide, con herencia disómica (Voisey *et al.*, 1994). Posee un mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica y por ello la autofecundación es infrecuente. El tamaño de 1C de su genoma es de 956 Mbp (Leitch y Bennet, 2004).

El mejoramiento de trébol blanco en el mundo data de alrededor de 100 años, con la liberación de un número de cultivares que ya supera los 300 y que se encuentran registrados en OECD (Caradus y Woodfield, 1997). De acuerdo a la información actual del Instituto Nacional de Semillas (INASE), en la Argentina se encuentran registrados 33 cultivares de trébol blanco, de los cuales 16 son de origen nacional.

Las poblaciones de trébol blanco se clasifican de acuerdo a la morfología. Específicamente el tamaño del folíolo ha permitido diferenciar distintos tipos denominados: pequeño, intermedio, grande y gigante o ladino. El cultivar El Lucero MAG, uno de los más difundidos por su amplia adaptación y utilizado durante décadas en las pasturas cultivadas en Argentina, pertenece al tipo de folíolo grande (Scheneiter y Pagano, 1995).

En los programas tradicionales de mejoramiento genético los estudios de variabilidad de *T. repens* se han concentrado básicamente en caracteres morfofisiológicos y agronómicos (Pagano, 1995; Annicchiarico, 2003; Bouton *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Los atributos morfológicos han sido utilizados para la caracterización de germoplasma (Rosso y Pagano, 2001) y sobre la base de aspectos cualitativos como manchas blancas, presencia de antocianinas y liberación de ácido cianhídrico (HCN), se han caracterizado cultivares de diferentes orígenes conservados en el Banco de Germoplasma de INTA (Rosso *et al.*, 2001).

Sin embargo, en algunos casos, los caracteres morfofisiológicos no proporcionan una cuantificación adecuada de la variabilidad genética, la que puede ser sobrestimada debido a la plasticidad fenotípica (Novoplansky, 2002) generalmente presente en las especies forrajeras.

Históricamente, la descripción de cultivares y la protección de los derechos de propiedad se han basado en caracteres morfológicos, pero actualmente los marcadores moleculares son una herramienta importante para complementar la caracterización fenotípica (Karp *et al.*, 1997; Aman, 2002), ya que permiten estudiar de forma directa la variación presente en el ADN sin la influencia del ambiente.

Los marcadores moleculares permiten la selección de caracteres basados en el genotipo y, en consecuencia, pueden acortar etapas en los programas de mejoramiento genético. Pueden ser utilizados en la selección temprana en fase de plántula, cuando caracteres como persistencia vegetativa o rendimiento de semilla no se expresan aún (Kölliker *et al.*, 2001a).

Un importante número de marcadores de ADN fueron desarrollados en las últimas décadas, lo que permite evaluar con precisión la variación genética a nivel inter- e intraespecífico de esta especie. Entre ellos se pueden mencionar polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (Hughes *et al.*, 1990), ADN polimórfico amplificado al azar (*Random Amplified Polymorphic* DNA, RAPD) (Gustine *et al.*, 2002; Bortolini *et al.*, 2006), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, AFLP) (Kölliker *et al.*, 2001b) e intrasecuencias simples repetidas (*Inter-Simple Sequence Repeats*, ISSR) (Dalla Rizza *et al.*, 2007).

De los marcadores moleculares disponibles en la actualidad, los microsatélites o secuencias simples repetidas (*Simple Sequence Repeats*, SSR) son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 nucleótidos repetidos, ampliamente dispersas en los genomas eucariontes y altamente variables entre individuos. Los altos índices de heterocigosis para estos marcadores, su naturaleza codominante, y el hecho de que la técnica está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), hace que los SSR sean generalmente elegidos en programas de selección asistida por marcadores moleculares, en estudios de mapeo genético y de diversidad.

En la última década se han desarrollado y caracterizado exitosamente alrededor de 100 SSR en trébol blanco (Kölliker *et al.*, 2001a). Sin embargo, Dolanská y Curn (2004) indicaron que los SSR desarrollados por Kölliker *et al.* (2001a) mostraron bajo polimorfismo en esta especie, mientras que George *et al.* (2006) detectaron un amplio polimorfismo para estos mismos marcadores. Una comparación del mapa de localización de marcadores procedentes de trébol blanco, trébol rojo y alfalfa reveló una posible macrocolinealidad entre las tres especies trifoliáceas (Zhang *et al.*, 2007).

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) detectar la capacidad de los marcadores SSR en la diferenciación genética e identificación de cultivares de trébol blanco, ii) determinar la relación entre los agrupamientos de cultivares basados en marcadores moleculares y caracteres morfoagronómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivares seleccionados para este estudio provienen de diversos orígenes del mundo (Tabla 1) y son conservados en forma de semilla en el Banco de Germoplasma de la EEA INTA Pergamino (BAP).

Además de los cultivares de trébol blanco, se incluyeron en el análisis dos cultivares de trébol rojo de diferente ciclo vegetativo: El Sureño MAG (Argentina) y Redland II (EUA).

Aproximadamente cuatro semanas después de la germinación de las semillas, se cosecharon hojas jóvenes de 30 plántulas de cada cultivar, y se compuso una muestra de aproximadamente 200 mg. Cada muestra fue liofilizada y molida en un homogeneizador de tejidos (*Tissue lyser,* Qiagen). Para la extracción de ADN genómico se siguió el protocolo de Puecher *et al.* (2001). El ADN fue disuelto en agua HPLC y la concentración final se estimó mediante gel de agarosa 0,8 % (p/v) por comparación de la intensidad de fluorescencia de bromuro de etidio con concentraciones conocidas del bacteriófago lambda DNA (Promega, Madison, WI).

Quince pares de cebadores genómicos (Kölliker *et al.*, 2001a) fueron marcados con un fluorocromo en su extremo 5´ (FAM; HEX (*Alpha DNA*) o NED (*Applied Biosystems*) y utilizados para las reacciones de PCR (Tabla 2).

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 20ml compuesto por: 75ng/ml ADN, 1X PCR *buffer Invitrogen*, 2,5mM de Cl_2Mg, 0,125mM de cada uno de los cebadores SSR, 0,15mM de dNTP, 0,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa, utilizando un termociclador *Mastercycler Epgradient S, Eppendorf*. El ciclado fue de 10 min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 1 min para desnaturalizar el ADN a 94° C, 30 s para la hibridación de los cebadores a 55° C, 1 min a 72° C bajando 1° C hasta llegar a los 45° C para la amplificación, y un paso de extensión final de 10 min a 72° C.

Los productos de amplificación fueron sembrados en geles de agarosa *Metaphor* 2%, utilizando 1X *orange green buffer*, en TBE 1X, con bromuro de etidio (0,5 g/l). La corrida electroforética se realizó a 50 V durante 40 min. Para estimar los tamaños de los productos amplificados se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*).

Los productos de amplificación fueron separados en el analizador genético ABI PRISM 3100, de *Applied Biosystems.* Mediante el *software* GeneMapper se analizaron los picos correspondientes a los distintos alelos, utilizando GeneScan 500 (-250) ROX (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) como estándar de peso.

Se utilizaron caracteres morfoagronómicos de 15 cultivares obtenidos de la base de datos del BAP, que se habían originado en un ensayo previo realizado en la EEA Pergamino (Rosso *et al.*, 2001). Los caracteres evaluados fueron: número de hojas a inicio de estolonización, vigor de plántula, fecha de inicio de estolonización primaria (días desde germinación), fecha de inicio de estolonización secundaria (días desde germinación), número de estolones primarios antes del trasplante, longitud total de estolones primarios (cm), número de estolones secundarios antes del trasplante, longitud total de estolones secundarios (cm), diámetro del estolón en invernáculo (mm), mancha blanca (Brewbaker y Carnahan, 1956), longitud del pecíolo (mm), longitud del folíolo (mm), ancho del folíolo (mm), longitud del estolón a campo (cm), diámetro del estolón a campo (mm), diámetro de la planta (cm), número de inflorescencia/estolón, número de folíolos/estolón, tamaño del folíolo, forma como la relación largo/ancho y total de inflorescencias/ m^2.

Análisis estadístico

El trébol blanco es un tetraploide con cuatro juegos de cromosomas y por lo tanto, puede tener hasta cuatro alelos diferentes en un determinado locus. Debido a esto, las bandas polimórficas SSR de cada muestra fueron evaluadas como dosis únicas.

Los alelos de cada SSR fueron transformados en datos de presencia (1) y ausencia (0) e incorporados a una matriz binaria con filas (cultivares) y columnas (tamaños de los alelos). Dicha matriz se utilizó para calcular los valores de similitud genética mediante el índice de Dice y para determinar la relación se aplicó el método de asociación UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using an arithmetic Average*). La agrupación resultante se graficó como un

dendrograma. El coeficiente de correlación cofenética fue calculado por comparación entre la matriz de distancia genética original y la matriz cofenética.

Para la comparación de las matrices morfológicas y moleculares de los 15 cultivares evaluados en el campo, se utilizó el Test de Mantel (Mantel, 1967). Para la agrupación de cultivares en base a los 21 caracteres morfoagronómicos, se aplicó el índice de distancia euclídea y UPGMA. El agrupamiento fue representado gráficamente mediante un dendograma.

Los programas estadísticos utilizados en los distintos análisis de este trabajo fueron: INFOGEN/P versión 2006i.1 (Balzarini *et al*., 2003) y NTSYS pc versión 2.0 (Rohlf, 1998). Se utilizó el programa estadístico *Winboot* (Yap y Nelson, 1996*)* para obtener en porcentaje la probabilidad de ocurrencia de agrupamiento.

RESULTADOS

Los resultados corresponden por una parte al análisis molecular de 24 cultivares de trébol blanco y dos cultivares de trébol rojo y por otra al análisis molecular y morfológico de los 15 cultivares de trébol blanco.

Análisis molecular de 24 cultivares de trébol blanco

Se obtuvieron un total de 114 alelos, con un porcentaje de bandas polimórficas de 99,24 % con 14 SSR, ya que el cebador B01B05 no presentó bandas definidas. El promedio de bandas por SSR fue de 8,66.

Los cultivares se agruparon entre 14 % y 83 % de similitud. Los cultivares más similares fueron Zapicán y Haifa, obtenidos respectivamente en Uruguay y Australia, a partir de poblaciones aparentemente de distinto origen, pero que comparten caracteres de alta cianogénesis y tamaño de planta. Los cultivares más distantes fueron de origen neozelandés, con una similitud menor a 50 %. En este grupo se determinó que los más cercanos fueron G. Sustain y G. Demand. El cultivar G. Prestige mostró una gran separación del resto de los cultivares, tal como ocurrió con los cultivares de trébol rojo.

Se observó que los dos cultivares de trébol rojo, Redland y El Sureño MAG se unieron en un grupo pero en un nivel de similitud menor de 50 %. Los valores de probabilidad de agrupamiento fueron elevados en términos generales, confirmando así la consistencia de los agrupamientos observados en el dendograma (Figura 1). La correlación cofenética fue de 0,959.

Análisis morfológico y molecular en 15 cultivares de trébol blanco

El análisis estadístico de los datos moleculares se realizó sobre los 15 cultivares para los que se contaba con datos morfológicos previos (Rosso *et al*., 2001). Los resultados de la clasificación de los cultivares basados en los caracteres antes indicados se muestran por medio del dendograma correspondiente de la Figura 2. Se puede observar que los cultivares se dividieron en dos grupos, diferenciándose según el tipo foliar (foliolos grandes o pequeños).

Cuando los 15 cultivares fueron agrupados mediante la información proveniente de los marcadores SSR, se mantuvo una tendencia de agrupamiento de acuerdo a los tipos foliares, aunque no fue tan discriminatoria como el agrupamiento basado en la morfología. La correlación entre matrices fue significativa con un valor intermedio (r= 0,48).

DISCUSIÓN

En el análisis molecular, el tamaño del fragmento de los SSR amplificados osciló en un rango de 82 a 270 pb, en coincidencia con lo informado por George *et al*. (2006), quienes obtuvieron un rango de 89 a 308 pb utilizando los mismos cebadores. De los 15 cebadores probados en el presente trabajo, solamente B01B05 no fue utilizado para el análisis, debido a que no hubo amplificación ni en geles de agarosa *methaphor* ni en las corridas en el analizador genético, en contraste con los resultados reportados por George *et al*. (2006).

Los loci SSR que amplificaron en trébol blanco, *T. repens,* también lo hicieron en trébol rojo, *T. pratense*, confirmando la potencialidad de amplificación cruzada de estos marcadores. Además, pudo determinarse que cinco de estos SSR presentaron amplificación en alfalfa, *Medicago sativa* (datos no mostrados).

Kölliker *et al*. (2001b) diseñaron cebadores y los analizaron con distintas especies de *Trifolium*. En siete genotipos de *T. repens* provenientes de los cultivares Dusi, Haifa y Prop y las líneas I5J y I4R, dichos investigadores encontraron un promedio de 4,8 fragmentos amplificados por SSR. Si realizamos la comparación con nuestros, resultados, el promedio de 8,66 fragmentos amplificados que obtuvimos por SSR representa aproximadamente el doble del valor obtenido por Kölliker *et al*. (2001a). No obstante, se debe

considerar que en el presente trabajo se utilizaron conjuntos (*bulks*) de ADN de 25 a 30 genotipos por cultivar y que, finalmente, se analizaron 24 cultivares en los que estaban incluidos los tres cultivares estudiados por Kölliker *et al*. (2001a). Los conjuntos podrían explicar el aumento en la cantidad de fragmentos amplificados en el presente estudio. En el mismo sentido se podría explicar el alto grado de polimorfismo (99 %) que detectamos al considerar los 14 SSR y todos los cultivares, en comparación con lo informado por Kölliker *et al*. (2001a) en los siete genotipos de trébol blanco: 88 % de polimorfismo pero utilizando un número mayor de SSR. George *et al*. (2006) hallaron un alto grado de polimorfismo con los mismos 15 SSR (datos no informados) utilizados en el presente trabajo.

Estudios realizados en el IGEAF INTA en otras forrajeras alógamas han mostrado altos porcentajes de polimorfismos. Por ejemplo en el análisis molecular de más de una centena de introducciones de festuca alta se encontraron valores cercanos a 100 % de polimorfismo (Cuyeu *et al*., 2010). Campos de Quiroz y Ortega-Klose (2001) también han expresado que las plantas forrajeras alógamas presentan un elevado nivel de diversidad genética y que la misma puede ser eficientemente determinada mediante este tipo de marcadores genéticos.

Los resultados de la correlación cofenética mostraron la existencia de un buen ajuste entre la matriz de similitud y el agrupamiento posterior. En la Figura 1 se observa que los 24 cultivares de *T. repens* se agruparon entre un 14 y 83 % de similitud, mientras que Bortolini *et al*. (2006), al evaluar 78 introducciones de 50 países, conservadas por el USDA, encontraron que los materiales se agruparon entre un 18 y 58 % de similitud mediante RAPD. El mayor rango de distribución de los agrupamientos de los 24 cultivares podría deberse a la aplicación del conjunto de SSR polimórficos según mencionan otros autores (George *et al*., 2006). En este análisis se observó que los cultivares con mayor similitud fueron Zapicán (Uruguay) y Haifa (Australia), mientras que los cultivares que más se separaron fueron los de origen neozelandés. El cv. Grassland Prestige presentó el nivel más alto de divergencia respecto de los restantes cultivares, similarmente a lo obtenido por George *et al*. (2006).

En el estudio morfológico realizado con 15 cultivares de trébol blanco (Figura 2) se observó que los mismos formaron tres grupos bien definidos, que corresponden principalmente a los tipos de trébol según tamaño de folíolo. Además, ello fue consistente con la información bibliográfica sobre los cultivares utilizados en este estudio (Caradus *et al*., 1989; Caradus y Woodfield, 1997). Así, se conformaron grupos de acuerdo a tamaño de folíolo, a saber: grandes a gigantes (el más numeroso) con ocho cultivares; pequeños (Nora y S184); y medianos, que incluyó a los restantes cultivares. Esto concuerda con la bibliografía en la que se indica que los caracteres foliares son los de mayor incidencia en la clasificación de materiales de la especie. Estos caracteres están asociados al tamaño de planta y a la adaptación a distintas condiciones ambientales. En la clasificación de los mismos cultivares basada en los datos moleculares se observó que, aunque no se formaron grupos definidos como en la clasificación a partir de caracteres fenotípicos, hubo una tendencia en la distribución grupal de los cultivares de acuerdo al tamaño foliar. Así, el cultivar S184 que corresponde al tipo de folíolos más pequeños presentó el menor porcentaje de similitud, diferenciándose del resto, en tanto que los cultivares de folíolos grandes a gigantes tendieron a agruparse entre sí.

Por el contrario, otros autores como Gustine *et al*. (2002) detectaron agrupamientos conformados por poblaciones de folíolos grandes y pequeños mediante RAPD. Es posible que las poblaciones analizadas por esos autores tuvieran mayor variabilidad intrapoblacional para el carácter foliar, mientras que en los cultivares del presente trabajo es altamente probable que la selección de los genotipos paternos se haya realizado sobre un mismo tipo foliar. Esto explicaría la detección de correlación positiva entre las matrices morfológica y genética y, como consecuencia, la obtención de una clasificación similar con datos morfológicos y moleculares.

Tabla 1. Cultivares de trébol blanco, orígenes y características.

S184	Reino Unido	Folíolos muy pequeños y estolones delgados. Baja producción de ácido cianhídrico.
Dubrava	Rep. Checa	Folíolo intermedio, escasa presencia de mancha foliar blanca. Floración tardía.
Blanca	Bélgica	Folíolo mediano a grande, de floración intermedia y alto contenido de ácido cianhídrico.
Dusi	Sudáfrica	Acianogenético. Raíces gruesas. Seleccionado sobre 78 cultivares en suelos ácidos y sequía.
Haifa	Australia	Deriva de poblaciones israelitas. Hábito erecto. Cianogenético y mancha foliar blanca intensa.
Sonja	Suecia	Folíolos intermedios a grandes. Cianogénesis baja. Floración intermedia y alta persistencia.
Nora	Suecia	Foliolo pequeño, sin macula y acianogenético. Floración abundante. Tolerante a sequía.
Grassland Prestige	Nueva Zelanda	Folíolos pequeños a mediano. 69 % cianogénicas. Deriva de ecotipos neocelandeses.
Estanzuela Zapican	Uruguay	Folíolos medianos a grandes. 90 % cianogénicas. Floración temprana y profusa.
Merwi	Bélgica	Folíolo intermedio. Cianogenético. Alta producción de semilla y buena persistencia.
El Lucero MAG	Argentina	Foliolos grandes. Amplia adaptación y productivo
Lucero Plus INTA	Argentina	Deriva de El Lucero MAG. Se diferencia por ausencia de mácula blanca y mayor persistencia.
Grassland Sustain	Nueva Zelanda	Folíolos medianos a grandes y de alta densidad de puntos de crecimiento.
Espanso	Italia	Folíolos gigantes. Bajo a nulo contenido de ácido cianhídrico. Buena resistencia a sequía.
Churinche	Argentina	Folíolos medianos a grandes y pecíolo largo. 73 % cianogénicos. Resistente a sequía.
California	EE.UU.	Folíolos grandes, baja concentración de ácido cianhídrico en solo el 10 % de las plantas.
Bayucua	Uruguay	Seleccionado de población Argentina. 85 % cianogenético. Alta densidad de floración.
Grasland Demand	Nueva Zelanda	Hojas pequeñas a medianas y estolones finos. Deriva de ecotipos de N. Z. y del Mediterráneo.
Susi	Irlanda	Seleccionado de un ecotipo iraní. Folíolos medianos a pequeño. 83 % cianogenético.
Waverley	Australia	Folíolos grandes. Floración temprana. Cianogenético. Deriva de Haifa y Tamar.
Grassland Pitau	Nueva Zelanda	Folíolos medianos a grandes, pocos estolones. Deriva de G. Huia y una población de España.
Omega INTA	Argentina	Seleccionado sobre poblaciones de Oriente Medio. Ciclo reproductivo tardío.
Simone	Italia	Desarrollado sobre ecotipos Italianos. Presenta foliolos medianos a grandes.
Prop	Nueva Zelanda	Deriva de ecotipos naturalizados de Waikato. Hábito postrado. Floración temprana.

BIBLIOGRAFÍA

Aman R.A. (2002) A comparative assessment of molecular techniques employed in genetic diversity studies (and their suitability in resource-limited settings). National Museums of Kenya, Nairobi, Kenya. IPGRI.

Annicchiarico P. (2003) Breeding white clover for increased ability to compete with associated grasses. J. Agric. Sci. 140: 255-266.

Balzarini M., Di Rienzo J. (2003) Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Bortolini F., Dall´Agnol M., Schifino-Wittmann M.T. (2006) Molecular characterization of the USDA white clover (*Trifolium repens L.*) core collection by RAPD markers. Genet. Res. Crop Evol. 53: 1081-1087.

Bouton J.H., Woodfield D.R., Hoveland C.S., McCann M.A., Caradus J.R. (2005) Enhanced survival and animal performance from ecotype derived white clover cultivars. Crop Sci. 45: 1596-1602.

Brewbaker J.L., Carnahan H.L. (1956) Leaf-marking alleles in white clover. J. Hered. 47: 103-104.

Campos de Quiroz H., Ortega-Klose F. (2001) Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pretense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. Euphytica 122: 61-67.

Caradus J., Mackay A., Woodfield D., Van Den Bosch J., Wewala S. (1989) Classification of a world collection of white clover cultivars. Euphytica 42: 83-196.

Caradus J.R., Woodfield D.R. (1997) World checklist of white clover varieties New Zealand J. Agric. Res. 40: 115-206.

Cuyeu A.R., Pagano E.M., Rosso B.S., Biagioli C.A., Cattoni M.I., Schrauf G.E., Carrete J.R., Rimieri P., Ríos R.D. (2010) Genetic characterization of the Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) collection from the Pergamino Active Forage Bank using SSR markers. 6th Intern. Symp. Molecular Breeding of Forage and Turf, Buenos Aires Argentina. INTA.

Dalla Rizza M., Real D., Reyno R., Porro V., Burgueño J., Errico E., Quesenberry K. (2007) Genetic diversity and DNA content of three South American and three Eurasiatic Trifolium species. Genet. Mol. Biol. 30: 1118-1124.

Dolanská I., Curn V. (2004) Identification of white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using molecular markers. Plant Soil Environ. 50 (3): 95-100.

George J., Dobrowolski M.P., Zijll de Jong E., Cogan N.O.I., Smith K.F., Forster J.W. (2006) Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by SSR polymorphisms. Genome 49: 919-930.

Gustine D., Voigt P., Brummer C., Papadopoulos Y. (2002) Genetic Variation of RAPD Markers for North American White Clover Collections and Cultivars. Crop Sci. 42: 343-347.

Hughes M.A., Sharif A.L., Dunn M.A., Oxtobi E., Pancoro A. (1990) Restriction fragment length polymorphism segregation analysis of the *Li* locus in *Trifolium repens* L. Plant Mol. Biol. 14: 407-414.

Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G., Hodgkin T. (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies (IPGRI technical bulletin #2). Intern. Plant Genet. Res. Inst., Rome.

Kölliker R., Jones E.S., Drayton M.C., Dupal M.P., Forster J.W. (2001a) Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). Theor. Appl. Genet. 102: 416-424.

Kölliker R., Jones E., Jahufer M., Forster J.W. (2001b) Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white. Euphytica 121: 305-315.

Leitch I.J., Bennett M.D. (2004) Genome downsizing in polyploidy plants. Biol. J. Linnean Soc. 82: 651-663.

Mantel N. (1967) The detection of diseases clustering and generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.

Novoplansky A. (2002) Developmental plasticity in plants: implications of noncognitive behavior. Evol. Ecol. 16: 177-188.

Pagano E.M. (1995) Variabilidad genética en la población de trébol blanco *Trifolium repens* L. "El Lucero MAG". Tesis de Magister Scientiae. INTA-UNR.

Puecher D., Robredo C., Rios R., Rimieri P. (2001) Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. Euphytica 121: 229-236.

Rohlf F. (1998) NTSYS-pc: Numeral taxonomy and multivariate analysis system versión 2.0. Department of Ecology and Evolution State University of New York. Stony Brook. NY.

Rosso B., Pagano E. (2001) Collection and characterization of naturalized populations of white clover in Argentina. Genet. Res. Crop Evol. 48: 513-517.

Rosso B., Pagano E., Rimieri P. (2001) Caracteres que permiten la diferenciación de cultivares de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Actas III Simposio de Recursos Genéticos de América Latina y el Caribe, Brazil, pp. 406-408.

Scheneiter O., Pagano E.M. (1995) Crecimiento estacional de estolones de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). En: Memorias XIV Reunión Latinoamericana de Producción Animal y 10º Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata 26/11-1/12, pp. 40-42.

Voisey C.R., White D.W.R., Mc Gregor P.G., Wingley P.J., Chilcott C.N. (1994) Release of transgenic white clover plant sexpressing Bacillus thuringiensis genes -an ecological perspective. Biocontrol Sci. Technol. 4: 475-481.

Yap V.I., Nelson J.R. (1996) WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI (Int. Rice Res. Inst.) Res. Pap. Ser. No. 14, 6.

ZhangY., Sledge M.K., Bouton J.H. (2007) Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. Theor. Appl. Genet. 114:1367-1378.

Zhang Y., Ji H., Zhao P.X., Bouton J.H., Monteros M.J. (2008) Genome-wide identification of microsatellites in white clover (*Trifolium repens* L.) using FIASCO and phpSSRMiner. Plant Methods 4:19.

BAG
Journal of Basic & A pplied Genetic s

EFFICACY OF ANTICOAGULANT DRUGS AS RODENTICIDES AND GENETIC VARIATION ON *Vkorc1* OF *Mus musculus* FROM BUENOS AIRES PROVINCE (ARGENTINA)

Espinosa M.B.[1]

[1]Instituto de Investigación en Biociencias Agrícolas y Ambientales(INBA).
Avda. San Martín 4453, C1417DSQ. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

mespinosa@agro.uba.ar

ABSTRACT

The relationship between anticoagulant rodenticides and the gene for vitamin K epoxide reductase has been extensively studied The significance of mutations in *Vkorc1* on the degree of response to anticoagulants is controversial. The implication of the VKORC1 function in pest control drives the attention to a wide range of factors that may be influencing the resistance to rodenticides, an issue that will be discussed in this article. Anticoagulants are used as rodenticides as well as to improve human health. The interactions between *VKORC1* and *CYP4F18* (cytochrome P450) are complex. It is likely that the coagulation response may be due to a diverse expression of the *Vkorc1* gene and its interaction with the expression of *Cyp4f18*, and to the polymorphisms present in both genes. We analyzed the presence of polymorphisms (especially the presence of mutations that produce substitutions of Tyr139Cys and Leu128Ser) in *Vkorc1* of the genome of *Mus musculus* belonging to local wild populations living in farms. The animals studied were from areas in which rodenticide anticoagulants (ej. bromadiolone) are commonly used as pest control. None of the studied mice showed any signs of anticoagulant resistance-related mutations in the *Vkorc1* gene. This study will enable a proper selection of the rodenticide method for pest control in local areas.

Key words: Vitamin K epoxide reductase, rodenticides, rodents.

RESUMEN

La relación entre los rodenticidas anticoagulantes y el gen de la vitamina K epóxido reductasa se ha estudiado ampliamente. La influencia e importancia de las mutaciones en *Vkorc1* sobre la respuesta a los anticoagulantes es un tema polémico. La importancia de la función para el control de plagas de *Vkorc1* conduce a centrar la atención en una amplia gama de factores que pueden influir en la resistencia a los rodenticidas. En este trabajo discutiremos este tema. Los anticoagulantes se utilizan tanto como rodenticidas como para mejorar la salud en humanos. Las interacciones entre *VKORC1* y *CYP4F18* (citocromo P450) son complejas. Es probable que la respuesta de coagulación se deba a una expresión diversa del gen *Vkorc1* y su interacción con la expresión de *Cyp4f18* y a los polimorfismos presentes en ambos genes: En este trabajo, se analizó la presencia de polimorfismos (especialmente la presencia de mutaciones que producen sustituciones de Tyr139Cys y Leu128Ser) en *Vkorc1* del genoma de *Mus musculus* de animales de poblaciones silvestres locales que habitan en granjas. Los animales estudiados provinieron de áreas en las que se utilizan comúnmente rodenticidas anticoagulantes (ej. bromadiolona) como control de plagas. Ninguno de los ratones estudiados presentó las mutaciones descriptas en el gen *Vkorc1* relacionadas con la resistencia a los anticoagulantes. Este estudio permitirá la elección adecuada del método rodenticida para el control de plagas en áreas locales.

Palabras clave: Vitamina K epóxido reductasa, rodenticidas, roedores.

INTRODUCTION

Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*) is a gene that codifies a transmembrane protein located in the endoplasmic reticulum, VKORC1. This protein was described in mammals (human, rat, mouse, dog and cow), fruit fly and zebra fish. It has three exons and, in the previously mentioned *taxa*, a similar amino acid sequence. Moreover, *VKORC1* is homologous -and conserved- in *Mus musculus*, humans and other *taxa*.

The *Vkorc1* gene is located in *Mus musculus* chromosome 7 (7F3; 7 61.0 cM). Research on this gene is continuous and active because VKORC is a key protein for the metabolic pathway of vitamin K, for which there are several features that remain unknown.

The amino acids related to resistance to warfarin are Tyr139 and Leu128, because the changes observed in animals with resistance to this anticoagulant are the replacement of tyrosine by cysteine, serine or phenylalanine and substitution of leucine by glutamic acid or serine (Pelz *et al.*, 2005).

The key enzyme responsible for vitamin K metabolism, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1), was identified as the target of anticoagulants used as rodenticides in pest control (warfarin, bromadiolone, and other related compounds) by Li *et al.* (2004) and Rost *et al.* (2004). Inhibition of blood coagulation is the basic principle used as pest control around the world. It was first observed in 1958 that rodents were able to develop resistance to anticoagulant rodenticides (Buckle *et al.*, 1994). After identification of the *Vkorc1* gene and mutations related to warfarin resistance (Rost *et al.*, 2004), it was confirmed that this is a genetic heritable condition and the *Vkorc1* gene is the subject of mutations that confer resistance to anticoagulants (Rost *et al.*, 2009). In rodents, three genomic sequence variants associated with loss of rodenticide efficacy are known. It is important to study the distribution and frequency of *Vkorc1* sequence variants to achieve a better understanding of the mechanism of action of anticoagulants and to improve performance on pest control. The first data about frequency and distribution of resistance-conferring sequence variants of *Vkorc1* in house mice were found in 30 populations in Germany, Switzerland and the Azores (Pelz *et al.*, 2012).

In this study, we analyzed the presence of mutations in *Vkorc1* in wild populations of *Mus musculus*. We performed sequence analysis and mutation screening in genomic DNA by PCR amplification of the three *Vkorc1* gene exons. The three exons of 20 mice revealed high homology with the *Vkorc1* gene. We did not find any significant polymorphism or mutations in any of the three exons.

MATERIALS AND METHODS

The animals studied were collected in the field from wild populations (Buenos Aires province) and they were treated following international rules for animal welfare. We used the recommendations from the Canadian Council of Animal Care Guide (resources on line). The locations of capture were Diego Gaynor (34°16' S; 59°13' W) and Capilla del Señor (34°17' S; 59°06' W), Buenos Aires Province. Animals were trapped with Sherman traps during summer (January and February) and spring (September and October) 2011, using an experimental design similar to the reported by Guidobono *et al.* (2010). Traps were conditioned with a bait of oats and peanut butter and were distributed in the field near poultry farms. Mice falling in traps were mostly adults (20-35 g of body weight). They were classified as *Mus musculus* on the basis of morphological phenotypes and geographic distribution. DNA was extracted from 20 specimens that were taken at random to analyze the presence of mutations in the *Vkorc1* gene by PCR and sequencing. Genomic DNA was obtained from small pieces of hepatic tissue according to standard procedures. Briefly, the tissue was transferred into a polypropylene microfuge tube containing 0.5 ml of DNA buffer and was mechanically disaggregated to obtain a cell suspension. After removal of the supernatant, the cell suspension was incubated overnight at 50-55 °C with gentle shaking in DNA digestion buffer (with proteinase K, 0.5 mg/ml final concentration). DNA extraction was carried out with neutralized phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). DNA was transferred to a new tube and precipitated with 100 % ethanol at room temperature. A range of 20 to 50 µg DNA was obtained per sample; dried DNA was resuspended in 100-200 µl TE buffer.

All PCR reactions were performed at the following cycling conditions: 94°C for 3', 25 cycles of 94 °C for 30", 58 °C for 30" and 72 °C for 1'30", followed by an extension time of 72 °C for 10'. After that, the tubes were stored at 4 °C until processing. Each PCR mixture contained PCR buffer minus Mg [1X], dNTP mixture [0.2 mM], $MgCl_2$ [1.5mM]; primers F and R [0.5 µM each]; DNA template 1µl; Taq DNA polymerase [1.5 units] (Taq DNA Polymerase, Recombinant - Invitrogen Cat N° 11615-010, as well as PCR buffer and $MgCl_2$, were purchased from the local Invitrogen representative). The final volume was 20 µl completed with sterile deionized water. PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels with a 100 bp DNA ladder (Invitrogen Cat N° 15628-019). After electrophoresis, the desired DNA bands were excised using a clean and sterile scalpel blade. Bands were visualized under UV transilluminator light and cut quickly (Figure 1). They were isolated in approximately 300 mg of agarose slices, that were transferred into 1.5 ml microcentrifuge tubes and incubated at 4 °C until derivation to the sequencing service.

Sequencing of PCR products was performed in an automatic sequencer, by the Sanger method, at the *Unidad de Genómica* of *Instituto de Biotecnología del INTA* (Argentina). Sense and antisense primers were purchased from Invitrogen. Nucleotide sequences of primers were (a) exon 1: 5' GACCAATCTTCCGGTAGGAG (forward primer), 5' CGACCCCAGACTCCAAAAT (reverse primer); (b) exon 2: 5' TGGAGCTTCTTGCTAATCACT (forward primer), 5' GGTGTCAATTGTCTGGGTCA (reverse primer); (c) exon 3: 5' GAAGCACCTGCTGTCTGTCA (forward primer), 5' GCCTTCTAGGAACCCACACA (reverse primer).

Sequences analysis of selected PCR products was performed with the Nucleotide Database (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (Mega BLAST). The nomenclature followed to designate genes and proteins was from the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat; http://www.informatics.jax.org/mgi-home/nomen/gene.shtml)

RESULTS

The PCR products (Figure 1) were sequenced. The *Vkorc1* sequences for the three exons for wild type mice (n= 20) were compared with the NCBI Reference Sequence: NT_039433.8 corresponding to *Mus musculus* strain C57BL/6J chromosome 7 (Figure 2). Length of sequences ranged from 36 to 315 base pairs. A maximum of 6 gaps was found in 3 % of the sequences. Identities between the sequences for vitamin K epoxide reductase complex from *Mus musculus* strain C57BL/6J and the wild type ranged from 87 to 100 %. There was no mutation for the *Vkorc1* sequence in any of 20 wild rodents analyzed. These analyses show that the *Vkorc1* exons sequence is well conserved in wild mice from the Buenos Aires populations used in this study. Although the sequences obtained partially cover the *Vkorc1* region, we consider them to be low-frequency single nucleotide polymorphisms (SNPs).

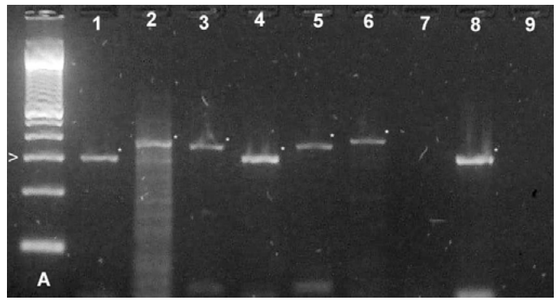


Figure 1. PCR products obtained from three representatives samples. Lines 1, 2 and 3 correspond to specimen 118 (exons 1, 2 and 3 respectively). Lines 4, 5 and 6 belong to the three exons of specimen 119, and lines 7, 8 and 9 match the three exons of specimen 120. Each DNA band (*) was sliced out of the gel and then purified and sequenced. Exons 1 and 3 (DNA template from sample 120) were not amplified in this PCR experiment. In cases like these, in which PCR was negative, amplification was repeated in order to obtain the corresponding amplification fragments.
In the first line (A), molecular weight marker (Invitrogen; Cat. N° 15628-019) was placed; the indicated band (>) corresponds to 300 base pairs.

```
Query  1         GCANGTTAGGNTAGTCTGGCATGAGGTGGGAACTCAGTGCTTTTTGGTCTNNNNNNNNNG  60
Sbjct  45641933  GCAAGTTAGGTTAGTCTGGCATGAGGTGGGAACTCAGTGCTTTTTGGTCTTGTGTTCTGG  45641992
Query  61        TACCTTCTGGAAGCTAAGCAACATCAGACCCACATTGATGGNNTAGGTGGTAATGCACAC  120
Sbjct  45641993  TACCTTCTGGAAGCTAAGCAACATCAGACCCACATTGATGGCATAGGTGGTAATGCACAC  45642052
Query  121       AATGCAGAAATCATATAACACAAAGAACAGGATCCAGGCCANGTACACGGAACCANCGAC  180
Sbjct  45642053  AATGCAGAAATCATATAACACAAAGAACAGGATCCAGGCCAGGTACACGGAACCAGCGAC  45642112
Query  181       GGACACCANGGAACTCAGCACCAGTAGGATAGAGGCCCAACGTCCCCTCAAGCAACCTGT  240
Sbjct  45642113  GGACACCAGGGAACTCAGCACCAGTAGGATAGAGGCCCAACGTCCCCTCAAGCAACCTGT  45642172
Query  241       AAAACAAGAGACGGTCAGTAATGGTATATCNAGAACTCTGTCATGCCTCCTCAATGACAG  300
Sbjct  45642173  AAAACAAGAGACGGTCAGTAATGGTATATCTAGAACTCTGTCATGCCTCCTCAATGACAG  45642232
Query  301       ACAGCAGGTGC  311
Sbjct  45642233  ACAGCAGGTGC  45642243
```

Figure 2. Results from sequence alignment of Mus musculus, exon 3, reverse primer. BLAST alignment shows that the sequence corresponds to Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 7 genomic contig, MGSCv37, C57BL/6J MMCHR7_CTG11. Sequence ID reference: NT_039433.8. Number of matches: 1. Range covered in the genomic context (Map Viewer): 45641933 to 45642243. Alignment parameters for segment: identities 294/311 (95%) and gaps 0/311 (0 %). Features: the sequence corresponds to vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 precursor.

DISCUSSION

Anticoagulant drugs have been used as pesticides against rats and mice from city and farm populations for more than 60 years. Rodents die due to internal bleeding. The alleged cause is that the activated form of vitamin K cannot be produced because the enzyme that catalyzes the reduction has mutated in resistant individuals.

Tyr139Cys and Leu128Ser were the mutations commonly seen in populations of mice from Germany, Switzerland and the Azores. It was found that less than 10 % of the individuals studied (n= 434) carried the wild-type genotype whereas more than 90 % of them presented mutations. However, in some geographical areas, particularly in the Azores and Switzerland, the frequency of mutations was very low or non-existent (Pelz *et al.*, 2012).

Recently it has been shown that resistance in sewer rats from Danish populations would not be associated with any mutation in the *Vkorc1* gene (Heiberg, 2009). In humans, it is known that not only the *VKORC1* gene is related to the response to anticoagulants; certain interactions between alleles of *CYP2C9* and *CYP4F2* with *VKORC1* affect the response to anticoagulant treatment in patients with thromboembolic risk (Rettie *et al.*, 2006; Kringen *et al.*, 2011). The potential polymorphisms in the cytochrome P450 family related to resistance to anticoagulants have not been studied in mice, but it is possible that not only genetic variants of *Vkorc1* may be acting as factors that influence resistance. Warfarin, bromadiolone and 4-hydroxycoumarin are the active substances found in rodenticides and these drugs are inhibitors in the synthesis of vitamin K-dependent clotting factors and coagulation. The poisoning treatment used by rodenticides is the delivery of intravenous vitamin K, which acts as "antidote". Given that vitamin K (forms K_1 and K_2) is found in vegetables, dairy products, meat and eggs, and considering that mice are omnivores, they could be eating the antidote at the same time as the poison. Even if farmers are applying rodenticides, rodents could be avoiding the ingestion of the poison. If house mice have a good source of food, they may avoid taking the poison. We think that the wrong management of feeding in poultry farms may be causing an overestimation of resistance to rodenticides. The basis of the low efficacy of anticoagulants used for rodent pest control may be a combination of the *Mus* sp. genotype and an inappropriate management during the application of anticoagulants in areas where rodents are plague.

REFERENCES

Buckle A.P., Prescott C.V., Ward J. (1994) Resistance to the first and second generationanticoagulant rodenticides. A New Perspective. Proceedings of the Sixteenth Vertebrate Pest Conference, pp. 138-144.

Guidobono J.S., León V., Gómez Villafañe I.E., Busch M. (2010) Bromadiolone susceptibility in wild and laboratory *Mus musculus* L. (house mice) in Buenos Aires, Argentina. Pest Manag. Sci. 66: 162-167.

Heiberg A. (2009) Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control? Pest Manag. Sci. 65: 444-449.

Kringen M.K., Haug K.B.F., Grimholt R.M., Stormo C., Narum S., Opdal M.S., Fosen J.T., Piehler A.P., Johansen P.W., Seljeflot I., Berg J.P., Brørs O. (2011) Genetic Variation of *VKORC1* and *CYP4F2* Genes Related to Warfarin Maintenance Dose in Patients with Myocardial Infarction. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011, Article ID 739751, 5 pages. Doi:10.1155/2011/739751.

Li T., Chang C.Y., Jin D.Y., Lin P.J., Khvorova A., Stafford D.W. (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nature 427: 541-544.

Pelz H.J., Rost S., Hünerberg M., Fregin A., Heiberg A., Baert K., MacNicoll A.D., Prescott C.V., Walker A., Oldenburg J., Müller C.R. (2005) The Genetic Basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents. Genetics 170: 1839-1847.

Pelz H.J., Rost S., Müller E., Esther A., Ulrich R.G., Müller C.R. (2012) Distribution and frequency of *VKORC1* sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. Pest Manag. Sci. 68 (2): 254-259.

Rettie A.E., Farin F.M., Beri N.G., Srinouanprachanh S.L., Rieder M.J., Thijssen H.H. (2006) A case study of acenocoumarol sensitivity and genotype-phenotype discordance explained by combinations of polymorphisms in *VKORC1* and *CYP2C9* Br. J. Clin. Pharmacol. 62 (5): 617-620.

Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Peltz H.J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E.G.D., Müller C.R., Strom T.M., Oldenburg J. (2004) Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature 427: 537-541.

Rost S., Pelz H.J., Menzel S., MacNicoll A.D., León V., Song K.J., Jäkel T., Oldenburg J., Müller C.R. (2009) Novel mutations in the *VKORC1* gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? BMC Genetics 10: 4 doi: 10.1186/1471-2156-10-4.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET), *Universidad Maimónides* and *Universidad de Buenos Aires* for providing us with the resources for this work. We are also grateful to Simone Hasenmüller, who willingly gave us the primers sequences used in this study. We extend our acknowledgements to Vanina León, Isabel G. Villafañe, María Busch and Victoria E. Firmenich for their help with the experimental work. This work was supported in part by CONICET grant PIP 11220080101410.

BAG
Journal of Basic & Applied Genetic s

C-BANDING PATTERNS AND MEIOTIC BEHAVIOR IN *HYPSIBOAS PULCHELLUS* AND *H. CORDOBAE* (ANURA, HYLIDAE)

Baraquet M.[1,2], Salas N.E.[1], Martino A.L.[1]

[1] Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina.
[2] CONICET

mbaraquet@exa.unrc.edu.ar

ABSTRACT

In this work, we observed and evaluated C-banding patterns and meiotic behaviour of *Hypsiboas pulchellus* and *H. cordobae*. Twenty metaphasic cells per individual were analyzed, which were obtained from intestinal and testis cells using conventional and C-banding techniques. The two species presented *2n*= 24 chromosomes. Pairs 1 and 8 to 12 were metacentric whereas pairs 2 to 7 were submetacentric. The centromeric region of all chromosomes was positively C-banded but the C-banding pattern varied between species. At meiosis, cells with 12 bivalents were observed. Bivalents usually presented two terminal chiasmata, although the largest pair presented only one terminal chiasma. The cytogenetic data reconfirms the diploid somatic chromosome number of *H. pulchellus* and *H. cordobae*, species that exhibited identical chromosome morphology. The remarkable similarities between the two species are an indication of the close relationship among members of the *H. pulchellus* group; however C-banding patterns of *Hypsiboas* species are distinct and may be also referred to as species-specific. Meiotic behavior is quite similar to the behaviour of most frogs, which possess only one or two -usually terminal- chiasmata, resulting in the typical linear or ring appearance of bivalents.

Key words: Karyotypes, C-banding, Meiosis, *Hypsiboas pulchellus, Hypsiboas cordobae.*

RESUMEN

Este trabajo describe el patrón de Bandas-C y comportamiento meiótico de *Hypsiboas pulchellus* e *H. cordobae*. Se analizaron 20 figuras metafásicas por individuo, obtenidos de intestinos y testículos utilizando técnicas convencionales y de bandeo-C. Para ambas especies se determinó un número cromosómico de *2n*= 24. Los pares 1 y 8 a 12 mostraron morfología metacéntrica, y los pares 2 a 7 mostraron morfología submetacéntrica. Para las dos especies se encontró el mismo patrón de heterocromatina constitutiva en la región centromérica de todos los pares, pero el patrón de bandeo varió entre ellas. En meiosis se observaron células con 12 bivalentes. Los bivalentes mostraron normalmente dos quiasmas, pero en el bivalente mayor también se observó un único quiasma terminal. Los datos citogenéticos reconfirman el número diploide de *H. pulchellus* e *H. cordobae*, y muestran una morfología de los cromosomas idéntica para ambas especies, siendo esta similitud un indicio de la estrecha relación entre las especies del grupo *H. pulchellus*; sin embargo los patrones de Bandas-C de las dos especies de *Hypsiboas* son distintos, pudiendo ser esto reflejo de un carácter especie-específico. El comportamiento meiótico es similar al encontrado en otras especies de anuros por diversos autores.

Palabras clave: Cariotipos, Bandas-C, Meiosis, *Hypsiboas pulchellus*, *Hypsiboas cordobae*.

INTRODUCTION

The genus *Hypsiboas* Wagler (1830), which belongs to the Hylidae family, Hylinae subfamily and Cophomantini tribe, contains 84 species, most of them included in seven species groups. One of these is the *Hypsiboas pulchellus* group, which currently contains 36 species (Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2012; Köhler *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2011). This group includes *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841) and *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965), which are the object of the present study.

H. pulchellus is a widely distributed amphibian, occurring from Santa Catalina to Rio Grande do Sul in Brazil and in Uruguay, and also in the Argentinian provinces of Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, La Pampa, Chaco, Córdoba, Buenos Aires and northern Río Negro. Its sister species, *H. cordobae*, is also found in Argentina, in the hills of Córdoba and San Luis provinces (Barrio, 1962; 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1974; 1987; Basso and Basso, 1987; Basso, 1990; Martori and Ávila, 1992; Bridarolli and di Tada, 1994; di Tada *et al.*, 1996; Ávila *et al.*, 1999; di Tada, 1999; Langone and Lavilla, 2002; Faivovich *et al.*, 2004; Kwet *et al.*, 2004), but the exact limits of its range remain unknown, especially in the contact area with *H. pulchellus* (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Bridarolli and di Tada, 1994; Stuart, 2006).

These two species are similar in morphology and ecological features, and have been cytogenetically analyzed by various authors (Morescalchi, 1973; King, 1990; Barale *et al.*, 1991). Although the number of cytogenetic studies seems reasonable, the majority of them are reports of chromosome numbers and morphological phenotypes. Because chromosome studies may be of help to clarify phylogenetic and taxonomic relationships (Reyes Valdéz *et al.*, 2000), in the present study we redescribe the karyotypes *H. pulchellus* and *H. cordobae* with the aim of providing new data for the analysis of meiotic behavior and C-banding patterns.

MATERIALS AND METHODS

Our sample of *H. pulchellus* comprises 18 males specimens collected from different populations in Córdoba province: Río Cuarto (33° 06' 40.78" S, 64° 18' 16.88" W), Las Acequias (33° 15' 26.16" S, 63° 55' 15.10" W), Alejandro Roca (33° 21' 06" S, 63° 42 '10" W). Thirty-two males specimens of *H. cordobae* were collected from different populations in Córdoba and San Luis provinces: Achiras (33° 09' 28.64" S, 64° 58' 55.13" W), Las Guindas (32° 35' 35.22" S, 64° 42' 38.92" W), Pampa de Achala (31° 49' 41.8" S, 64° 51' 44.9" W), Los Linderos (32° 00' 54.05" S, 64° 56' 42.97" W), Los Tabaquillos (32° 23' 59.75" S, 64° 55' 33.69" W), La Carolina (32° 48' 43.94" S, 66° 05' 48.15" W).

Chromosome preparations were obtained as described by Baraquet *et al.* (2011), and by Schmid (1978), Schmid *et al.* (1979), Salas (2006) and Salas and Martino (2007). C-banding was done according to Sumner (1972).

Chromosomes were visualized using a Zeiss Axiophot-Axiolab and photographed using Axiocam HRc Zeiss. We analyzed 20 metaphasic cells per individual. On the metaphases the total length of each chromosome and the length of the four arms were measured using image analysis by Adobe® Photoshop® 9.0.

Data were processed using Microsoft Excel® 2000. Length of *p* and *q* arms, centromeric index, arm ratio, relative chromosome length and relative arm length were calculated using the following formulas:

Average length of arms *p* y *q*: $q = (q^1 + q^2)/2$

$p = (p^1 + p^2)/2$

Centromeric index (*i*): i = (length of the short arm of a chromosome (*p*) / total length of the chromosome $(p + q)$) × 100

Arm ratio (*r*): $r = q/p$

Relative chromosome length (*rl*): *rl* = (total length of chromosome / ∑ of length of chromosomes of the haploid set) × 100

Relative arm length (*rlq* o *rlp*): *rlq* or *rlp* = (length of the arms (*q* o *p*) / ∑ of length of chromosome of the haploid set) × 100

The data were processed to get the average for each species. The ideograms were carried out with these data, which was necessary because in the karyotypes the differences between chromosomes are not observable to the naked eye.

The chromosomes were classified according to Aiassa *et al.* (2001).

RESULTS

All populations of *H. cordobae* and *H. pulchellus* had *2n*= 24 chromosomes with a fundamental number NF= 48 (Figure 1). The twelve chromosome pairs can be classified into three groups. The chromosomes of pair 1 are large with a relative chromosome length of 16.20 % for *H. cordobae* and 12.26 % for *H. pulchellus*. Pairs 2 to 6 comprise a group of medium chromosomes with a relative chromosome length between 12.45 % and 7.58 % for *H. cordobae* and 10.63 % and 8.79 % for *H. pulchellus*. The remaining six chromosome pairs comprise a group of small chromosomes with a relative chromosome length between 6.57 % and 4.04 % for *H. cordobae* and 8.03 % and 3.90 % for *H. pulchellus* (karyotype formula 1: 5: 6) (Table 1, Figures 1, 2).

The chromosome morphology was always metacentric or submetacentric in the two species studied. Pairs 1 and 8-12 were metacentrics whereas the pairs 2-7 were submetacentrics.

C-banding showed the same pattern of constitutive heterochromatin at the centromeric regions of all pairs in the *H. pulchellus* and *H. cordobae*.

In *H. pulchellus* pericentromeric heterochromatin in all pairs, except pair 8, was observed. C-banding in the interstitial regions of the long arms of the pair 2 was observed. C-banded regions also appeared on the telomeric regions of the short arms of the pairs 1, 3, 5, 7 and 8, and in the long arms of the pairs 1-10 (Figure 3A y Table 2).

In *H. cordobae* revealed positively stained pericentromeric heterochromatin in the chromosomes of pairs 4, 5 and 8-12. C-banding in the interstitial regions of the short arms of the pair 1 was observed (Figure 3B y Table 2).

The meiotic analysis of males showed that the two species studied had 12 bivalents at diakinesis and 12 chromosomes at metaphase II cells (Figure 4A-D). The bivalents generally had two terminal chiasmata (ring-shaped bivalents).

In *H. cordobae* in most of the cells analyzed (78.50 %) the larger bivalent had one terminal chiasma (Figure 4C). This meiotic configuration was observed in the six populations studied; however, in the population of Pampa de Achala many of the cells exhibit the twelve bivalents ring-shaped (two terminal chiasmata). However, in *H. pulchellus*, most of the cells analyzed (69.23 %) exhibit all ring-shaped bivalents (Figure 4A) and only in Río Cuarto population the larger bivalent had one terminal chiasma in half of the cells (Table 3).

Table 1. Karyotype parameters for constructing *H. pulchellus* and *H. Cordobae ideograms*

P	*H. pulchellus*				*H. cordobae*			
	rl	*r*	*i*	T	*rl*	*r*	*i*	T
1	12.26	1.09	47.88	M	16.20	1.18	45.94	M
2	10.63	1.52	39.72	SM	12.45	1.71	37.74	SM
3	10.30	1.55	39.33	SM	11.33	2.14	33.26	SM
4	10.30	2.89	25.89	SM	10.55	2.73	27.81	SM
5	9.65	2.03	33.06	SM	9.54	2.59	31.81	SM
6	8.79	2.78	24.45	SM	7.58	2.95	28.53	SM
7	8.03	1.94	34.46	SM	6.57	1.94	35.08	SM
8	7.70	1.43	41.25	M	5.99	1.51	40.15	M
9	6.51	1.26	44.41	M	5.52	1.41	41.61	M
10	6.18	1.27	44.15	M	5.31	1.40	43.54	M
11	5.75	1.06	48.45	M	4.81	1.34	42.86	M
12	3.90	1.10	47.62	M	4.04	1.24	44.97	M

P: number of chromosome pairs; *rl*: chromosome relative length; *r*: arm ratio; *i*: centromeric index; T: Type, M: metacentric, SM: submetacentric.

Table 2. Distribution of heterochromatin in *H. pulchellus* and *H. cordobae.*

	H. pulchellus					*H. cordobae*		
P	**C**	**PC**	**BIq**	**Tp**	**Tq**	**C**	**PC**	**BIp**
1	+	+		+	+	+		+
2	+	+	+		+	+		
3	+	+		+	+	+		
4	+	+			+	+	+	
5	+	+		+	+	+	+	
6	+	+			+	+		
7	+	+		+	+	+		
8	+			+	+	+	+	
9	+	+			+	+	+	
10	+	+			+	+	+	
11	+	+				+	+	
12	+	+				+	+	

P: number of chromosome pairs; C: bands in centromeric regions; PC: bands in pericentromeric regions; BIp: bands in interstitial regions of short arms; BIq: bands in interstitial regions of long arms, Tp: bands in telomeric regions of short arms; Tq: bands in telomeric regions of long arms.

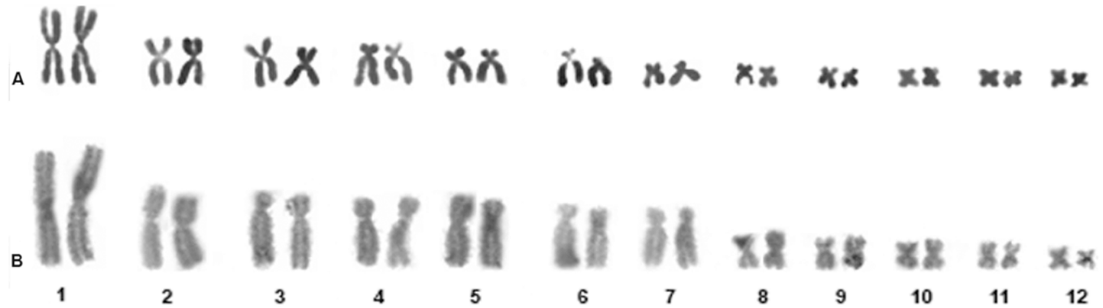


Figure 1. Karyotypes of *H. pulchellus* (A) and *H. cordobae* (B). (Bar=10 µm).

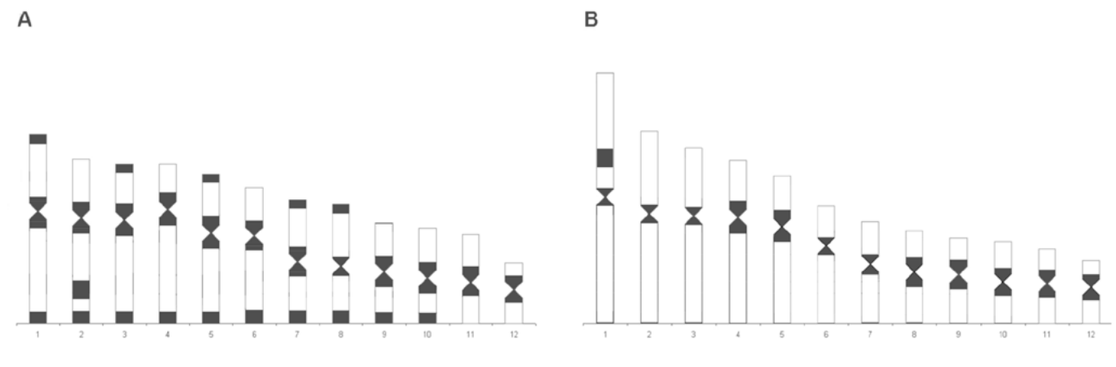


Figure 2. Karyotypes of *H. pulchellus* (A) and *H. cordobae* (B). (Bar=10 µm).
Ideograms based on the parameters presented in Table 1: *H. pulchellus (A)* and *H. cordobae* (B). Black areas indicate C-bands.

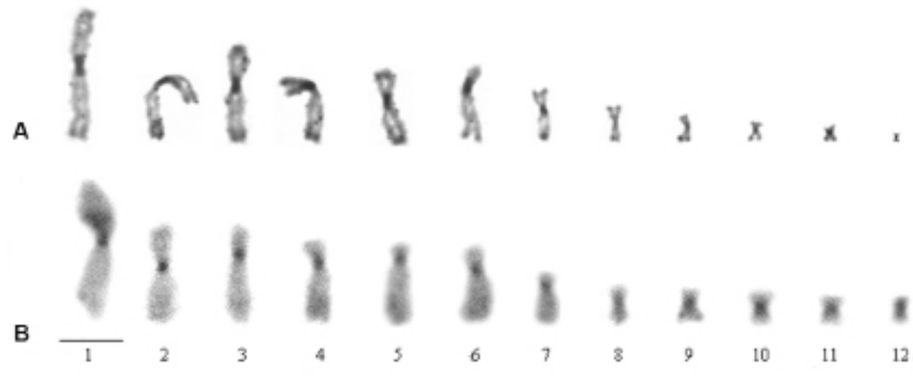


Figure 3. C-banded karyotypes of *H. pulchellus* (A) and *H. cordobae* (B). (Bar=10 µm)

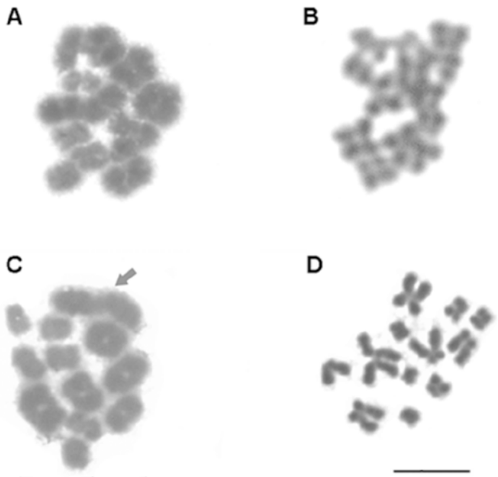


Figure 4. Meiotic cells of *Hypsiboas pulchellus* (A, B) and *H. cordobae* (B, C). (A) 12 bivalents with two terminal chiasmata. (B) Metaphase II with n= 12. (C) 11 ring-shaped bivalents and one bivalent with a terminal chiasma (arrow). (D) Metaphase II with n= 12 (D). (Bar=10 µm).

DISCUSSION

It is well known that most of Hylinae subfamily species have diploid chromosome numbers between 22 and 34 but most of the species within the genus *Hypsiboas* have a diploid complement 2*n*= 24 (Morescalchi, 1973; King, 1990).

Despite the differences in morphology and advertisement call between *H. pulchellus* and *H. cordobae* (Barrio, 1962; 1965; Cei, 1980; Basso and Basso, 1987; Gallardo, 1987; Faivovich *et al.*, 2004; Baraquet *et al.*, 2007), these species show the same diploid number (2*n*= 24) and a conserved chromosomal morphology.

Moreover, a comparison of known karyotypes of species of three of the five genus included in Cophomantini, *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, and *Hypsiboas* corroborates the remarkable similarity among them (Catroli *et al.*, 2011).

The diploid number of *H. pulchellus* and *H. cordobae* is largely in accordance with those previously described in the literature for these species (Bogart, 1973; Morescalchi, 1973; Barale *et al.*, 1991; Ananias, 1996) and was identical to other species of *Hypsiboas pulchellus* group (*H. caingua*, *H. prasinus*, *H. joaquini*, *H. semiguttatus*, *H. marginatus*, *H. guentheri*, *H. bischoffi*) (Baldissera *et al.*, 1993; Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004), and *Hypsiboas faber* group (*H. albomarginatus* and *H. faber*) (Carvalho *et al.*, 2009). In *Hypsiboas* the chromosome number and the morphology of the pairs is similar among species, with few or almost no differences among most of them. The only known species with a different chromosome number is *H. albopunctatus* with 2*n*= 22 (Gruber *et al.*, 2007; Catroli *et al.*, 2011).

About the chromosome morphology, metacentric or submetacentric for both species studied, our results are in agreement with King (1990). This author reported that *Hypsiboas* species with diploid complement 2*n*= 24 have metacentric or submetacentric karyotypes.

These results obtained here show that the two species have common features, however small differences in the chromosome size were observed.

The chromosome morphology of both species was similar to those reported by Barale *et al.* (1991) for *H. cordobae*. However, the metacentric morphology of pair 2 and subterminal morphology of pairs 4 and 6 reported by those authors is not observed for us in *H. cordobae.* For *H. pulchellus*, Ananias (1996) indicated submetacentric morphology in the pairs 9 and 10, and acrocentric morphology of the pair 6. However, our results did not show this structure.

According to Schmid *et al.* (1990), in the chromosomes of the Anura the centromeric/pericentromeric regions and telomeres are the preferential locations of heterochromatin. *H. cordobae* and *H. pulchellus* show the anuran pattern of constitutive heterochromatin: at centromeric regions in all chromosome pairs and at pericentromeric regions in some of them. We observed that the most important distinction between *H. pulchellus* and *H. cordobae* karyotypes was in the C-banding pattern.

Also, the comparison of the C-banding patterns of the two species studied with those previously described for the *Hypsiboas pulchellus* group and related species reveal that there are some common C-bands in most of them. *H. prasinus* (Baldissera, *et al.* 1993; Ananias, 1996), *H. joaquini* (Ananias, 1996), *H. guentheri* and *H. bischoffi* (Raber *et al.*, 2004), *H. marginatus* and *H. semiguttatus* (Ananias *et al.*, 2004) have a telomeric band in the long arm of chromosome 1 as in *H. pulchellus*. The C-banded chromosomes of *H. pulchellus* revealed heterochromatin at the pericentromeric regions of all pairs (except the pair 8) as in *H. guentheri* and *H. bischoffi* (Raber *et al.*, 2004). However, the telomeric heterochromatic band on the long arm of pair 10 observed in *H. pulchellus*, *H. guentheri* and *H. bischoffi* (Raber *et al.*, 2004), *H. marginata* and *H. semiguttata* (Ananias *et al.*, 2004), is not observed in *H. cordobae*.

Chromosome banding is a very important tool in comparative cytogenetics (Baldissera *et al.*, 1993). Interspecific comparisons of C-band patterns are a basic importance for cytotaxonomic studies (Schmid, 1978; Schmid *et al.*, 1990; Baldissera *et al.*, 1993). It has been shown that although many species of several amphibian genuses have a shared similarity in chromosome number and morphology, as we observed among the studied species, could be extensive differences in the position and amount of heterocromatin (Schmid, 1978; Schmid, *et al.*, 1990).

Regarding to meiosis, at diakinesis in both species 12 ring-shaped bivalents are observed, but frequently the larger bivalent present only one terminal chiasmata. These meiotic configurations have also been described by Baldissera *et al.* (1993) for four Brazilian *Hyla* species; by Martirosyan and Stepanyan (2007) for *Hyla savignyi*; and in diplotene cells of *Hypsiboas albopunctatus* (Gruber *et al.*, 2007). Also, Lourenço *et al.* (2003) observed in *Paratelmatobius cardosoi* (Leptodactylidae) that a high percentage of diakinesis showed the larger bivalent with only one terminal chiasmata and open configuration, as observed in this study. These authors explain that this open configuration probably is the result of a terminal association of the long arms of pair 1. The two species studied are quite similar from most frogs, which possess only one or two, usually terminal, chiasmata, resulting in the typical linear or ring appearance of bivalents (Morescalchi, 1973).

The cytogenetic data obtained in this paper reconfirms the diploid number of *H. pulchellus* and *H. cordobae* and show identical chromosome morphology; however we find that these species differ slightly in the heterochromatin pattern.

It has been noticed that most members of Cophomantini, and specifically members of the *H. pulchellus* group (Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004), share a similar chromosome morphology (Gruber *et al.*, 2007; Catroli *et al.*, 2011), and therefore, the remarkable similarities are no more than an indication of near relationship between *H. cordobae* and *H. pulchellus*. Even these similarities could be indication of a relationship between any member of the *H. pulchellus* group or with almost any other species of *Hypsiboas*, with the exception of some members of the *H. albopunctatus* group (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2007).

This work represents a significant contribution to redescription of the karyotype of *H. pulchellus* and *H. cordobae*, and a contribution with new data of meiotic behavior and C-banding patterns, not made so far.

REFERENCES

Aiassa D., Gorla N., Ávila L., Martori R. (2001) Cariotipo de *Liolaemus koslowskyi* Etheridge, 1993. Nuevo número cromosómico para el género (2n = 36). Rev. Esp. Herp. 15: 37-43.

Ananias F. (1996) Caracterizaçao cromossômica de espécies e subespécies de *Hyla* do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). Master thesis. State Univ. of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

Ananias F., García P.C.A., Recco-Pimentel S.M. (2004) Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Hereditas 140: 42-48.

Ávila L.J., Morando M., Priotto J.M. (1999) Amphibia and Reptilia of the high grasslands of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. B. Md. Herpetol. Soc. 35: 97-113.

Baldissera Junior F.A., Lopez de Oliveira P.S., Kasahara S. (1993) Cytogenetics of tour Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Rev. Brasil. Genet. 16: 335-345.

Barale G.D, di Tada I.E., Lisanti J.A. (1991) Descripción del cariotipo y ubicación del organizador nucleolar en *Hyla pulchella cordobae* (Anura, Hylidae) de la Pampa de Achala. Rev. UNRC 11: 31-34.

Baraquet M., Salas N.E., di Tada I.E. (2007) Variación geográfica en el canto de advertencia de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) en Argentina. Rev. Esp. Herp. 21:107-118.

Baraquet M., Valetti J.A., Salas N.E., Martino A.L. (2011) Redescription of the karyotype of five species of the family Bufonidae (Amphibia: Anura) from central area of Argentina. Biologia 66 (3): 543-547.

Barrio A. (1962) Los Hylidae de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires. Observaciones sistemáticas, ecológicas y análisis espectrográfico del canto. Phycis 23: 129-142.

Barrio A. (1965) Las subespecies de *Hyla pulchella* Duméril & Bibron (Anura, Hylidae). Phycis 25: 115-128.

Basso N.G. (1990) Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuro. Cuad. Herpetol. Serie monografías Nº 1.

Basso N.G., Basso G. (1987) Análisis acústico del canto de *Hyla pulchella pulchella* (Duméril & Bibron, 1841) (Anura: Hylidae). An. Mus. Hist. Nat. Valparaiso 18: 109-114.

Bridarolli M.E., di Tada I.E. (1994) Biogeografía de los Anfibios Anuros de la Región Central de la República Argentina. Cuad. Herpetol. 8: 63-82.

Bogart J.P. (1973) Evolution of anuran karyotypes. In: Vial J.L. (Ed.) Evolutionary biology of anurans. Univ. Missouri Press, pp. 337-349.

Carvalho K.A, Garcia P.C.A., Recco-Pimentel S.M. (2009) Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). Genet. Mol. Res. 8 (4): 1498-1508.

Catroli G.F., Faivovich J., Haddad C.F.B, Kasahara S. (2011) Conserved Karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic Analysis of 12 Species from 3 Species Groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). J. Herpetol. 45: 120-128.

Cei J.M. (1980) Amphibians of Argentina. Monit. Zool. Ital. (N.S.) 2: 1-609.

Di Tada I.E., Zavattieri M.V., Salas N.E., Martino A.L. (1996) Anfibios Anuros de la provincia de Córdoba. In: di Tada I.E., Bucher E.H. (Eds.) Biodiversidad de la provincia de Córdoba. Volumen I. Fauna. U.N.R.C., pp. 191-215.

Di Tada I.E. (1999) Patrones de distribución de los anfibios anuros de la provincia de Córdoba. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, U.N.C., Córdoba, Argentina.

Faivovich J., García P.C.A., Ananias F., Lanari L., Basso N.G., Wheeler W.C. (2004) A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Mol. Phylogenet. Evol. 32: 938-950.

Faivovich J., Haddad C.F.B, García P.C.A., Frost D.R., Campbell J.A., Weeler W.C. (2005) Systematic review of the frog Family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. B. Am. Mus. Nat. Hist. 294: 1-240.

Frost D.R. (2012) Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.6. Am. Mus. Nat. Hist., New York, USA. http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/ (accessed October 2012).

Gallardo J.M. (1974) Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires.

Gallardo J.M. (1987) Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Biblioteca Mosaico, Lib. Agropecuaria, Buenos Aires 98: 81-82.

Gruber S.L., Haddad C.F.B., Kasahara S. (2007) Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of 2n = 24 to 2n = 22 in the genus. Genetica 130: 281-291.

King M. (1990) Animal Cytogenetics. Vol. 4: Chordata 2. Amphibia. Gerbrüder Borntraeger Berlin Stuttgart.

Köhler J., Koscinski D., Padial J.M., Chaparro J.C., Handford P., Lougheed S.C., De La Riva I. (2010) Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). Zool. Scr. 39: 572-590.

Kwet A., Aquino L., Lavilla E., di Tada I. (2004) *Hypsiboas pulchellus*. IUCN Red List de Threatened Species. Version 2009.1. http://www.iucnredlist.org/ (accessed June 2009).

Langone J.A., Lavilla E.O. (2002) Comentarios nomenclatoriales sobre algunos taxa del grupo de *Hyla pulchella* (Anura: Hylidae). Cuad. Herpetol. 16: 73-78.

Lehr E., Faivovich J., Jungfer K.H. (2010) A new Andean species of the *Hypsiboas pulchellus* group: adults, calls and phylogenetic relationships. Herpetologica 66: 296-307.

Lehr E., Faivovich J., Jungfer K.H. (2011) Description of the tadpoles of *Hypsiboas aguilari* and *H. melanopleura* (Anura: Hylidae: *Hypsiboas pulchellus* group). Salamandra 47: 30-35.

Lourenço L.B., Garcia P.C.A., Recco-Pimentel S.M. (2003) Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the descriptionof an apparent case of pericentric inversion. Amphibia-Reptilia 24: 47-5.

Martirosyan A., Stepanyan I. (2007) The karyotype of *Hyla savignyi* Audouin, 1827 (Amphibia: Anura) from Southern Armenia. Comp. Cytog. 1(2): 107-112.

Martori R., Ávila L.J. (1992) Confirmación de la Presencia de *Hyla pulchella pulchella* para la Provincia de Córdoba (Argentina). Bol. Asoc. Herp. Arg. 8: 4-5.

Morescalchi A. (1973) Amphibia. In: Chiarelli A.B, Campanna E. (Eds.) Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. Academics Press, London, United Kingdom, pp. 233-348.

Raber S.C., Carvalho K.A., Garcia P.C.A., Vinciprova G., Recco-Pimentel S.M. (2004) Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). Phyllomedusa 3: 43-49.

Reyes Valdés M.H., Martínez M.G., García Osuna H.T. (2000) Número cromosómico y apareamiento meiótico en *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) Glass & Foster (Cactaceae). Acta Bot. Mex. 53: 17-25.

Salas N.E. (2006) Análisis cromosómico de *Odontophrynus americanus*, *O. achalensis*, *O. cordobae* y *O. occidentalis* (Anura: Leptodactylidae) de la provincia de Córdoba, Argentina. Rev. Esp. Herp. 20: 31-38.

Salas N.E., Martino A.L. (2007) Cariotipo de *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura Leptodactylidae). BAG, J. Basic Appl. Genet. 18: 1-5.

Schmid M. (1978) Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.

Schmid M., Olert J., Klett C. (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71: 29-55.

Schmid M., Steinlein C., Nanda I., Epplen J.T. (1990) Chromosome banding in Amphibia. In: Olmo E. (Ed.) Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. Birkhäuser Verlag Berlin, pp. 21-45.

Stuart S. (2006) *Hypsiboas cordobae*. IUCN Red List de Threatened Species. Version 2009.1. http//www.iucnredlist.org/ (accessed June 2009).

Sumner A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 75: 304-306.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first two authors thank the National Scientific and Technical Research Council (CONICET) for support. The Secretary of Science and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18C/225. We thank P. Grenat and J. Valetti for their help in the field and sample. Our study was authorized by Córdoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.).