



# 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**  
**THOMSON REUTERS**  
**SCOPUS**

Included in **SciELO**



**BUENOS AIRES - ARGENTINA**

U  
A  
B



## COMITÉ EDITORIAL

---

### Editor General:

**Dra. Elsa L. Camadro**

Área de Investigación en Agronomía  
EEA Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria (INTA), Fac. de Ciencias Agrarias,  
Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), y  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y  
Técnicas (CONICET)  
Balcarce, Argentina  
camadro.elsa@inta.gob.ar

### Editores Asociados:

#### Citogenética Animal

**Dra. Liliana M. Mola**

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,  
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de  
Buenos Aires (UBA), y CONICET  
Buenos Aires, Argentina  
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

#### Citogenética Humana

**Dra. Roxana Cerretini**

Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS,  
"Dr Carlos G Malbrán"  
Buenos Aires, Argentina  
rcerretini@gmail.com

#### Citogenética Vegetal

**Dra. Liliana M. Mola**

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,  
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA,  
y CONICET  
Buenos Aires, Argentina  
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

**Dr. José Guillermo Seijo**

Instituto de Botánica del Nordeste,  
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE),  
y CONICET  
Corrientes, Argentina  
seijo@agr.unne.edu.ar

#### Genética de Poblaciones y Evolución

**Dr. Jorge Cladera**

Instituto de Genética "Ewald Favret",  
Centro de Investigación en Ciencias. Veterinarias y  
Agronómicas,  
INTA  
Castelar, Argentina  
cladera.jorge@inta.gob.ar

**Dra. Noemí Gardenal**

Fac de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Córdoba (UNC),  
y CONICET  
Córdoba, Argentina  
ngardenal@unc.edu.ar

**Dr. Juan César Vilardi**

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,  
Fac. Ciencias Exactas y Naturales, UBA,  
y CONICET  
Buenos Aires, Argentina  
vilardi@bg.fcen.uba.ar

#### Genética Humana y Genética Médica

**Dr. Santiago Lippold**

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas  
(CEMIC)  
Buenos Aires, Argentina  
sel1@fibertel.com.ar

#### Genética Médica, Humana y Citogenética

**Dra. María Inés Echeverría**

Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas,  
Universidad Nacional de Cuyo (UNCu)  
Mendoza, Argentina  
miecheve@fcm.uncu.edu.ar

**Dra. Silvia Ávila**

Universidad Nacional de COMAHUE  
Hospital Castro Rendón  
Neuquén, Argentina  
silvia347@gmail.com

#### Genética Molecular (Animal)

**Dr. Guillermo Giovambattista**

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Fac. de  
Ciencias Veterinarias,  
Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y CONICET  
La Plata, Argentina  
ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

#### Genética Molecular (Vegetal)

**Dr. Alberto Acevedo**

Centro de Investigación de Recursos Naturales,  
INTA  
Castelar, Argentina  
acevedo.alberto@inta.gob.ar

**Dr. Andrés Zambelli**

Unidad de Negocios Nutrisun–Advanta Semillas SAIC  
Balcarce, Argentina  
andres.d.zambelli@gmail.com

#### Genética y Mejoramiento Animal

**Ing. (M. Sc.) Carlos A. Mezzadra**

Área de Investigación en Producción Animal,  
EEA Balcarce, INTA y  
Fac. de Ciencias Agrarias, UNMdP  
Balcarce, Argentina  
mezzadra,carlos@inta.gob.ar

## FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

---

### **Dra. Liliana A. Picardi**

*Cátedra de Genética, Fac. de Ciencias Agrarias,  
Universidad Nacional de Rosario (UNR)  
Zavalla, Argentina  
lpicardi@fcagr.unr.edu.ar*

### **Genética y Mejoramiento Genético Vegetal**

### **Dra. Natalia Bonamico**

*Facultad de Agronomía y Veterinaria,  
Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)  
Córdoba, Argentina  
nbonamico@ayv.unrc.edu.ar*

### **Dr. Ricardo W. Masuelli**

*EEA La Consulta, INTA  
Fac. de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo  
(UNCu), y CONICET,  
Mendoza, Argentina  
rmasuelli@fca.uncu.edu.ar*

### **Dra. Mónica Poverene**

*Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del  
Sur (UNS), y CONICET  
Bahía Blanca, Argentina  
poverene@criba.edu.ar*

### **Mutagénesis**

### **Dr. Alejandro D. Bolzán**

*Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis,  
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE),  
y CONICET  
La Plata, Argentina  
abolzan@imbice.gov.ar; abolzan64@gmail.com*

### **Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal**

### **Ing. Agr. (M.Sc.) Alberto R. Prina**

*Instituto de Genética "Ewald Favret", Centro de  
Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas,  
INTA  
Castelar, Argentina  
prina.albertoraul@inta.gob.ar*

### **Consultor Estadístico:**

### **Ing. Agr. Francisco J. Babinec**

*EEA Anguil, INTA, y  
Fac. de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa  
(UNLPam)  
La Pampa, Argentina  
babinec.francisco@inta.gob.ar*

### **Secretaría de Redacción:**

### **Dra. María de las Mercedes Echeverría**

*Fac. de Ciencias Agrarias, UNMdP  
Balcarce, Argentina  
echeverria.maria@inta.gob.ar*



### **Farmacogenética**

Autor: Lic. J. Federico Maune



### **Cultivo de maíz**

Provista por Ing. Agr. Carlos Biasutti (Dr.)



### ***Solanum lycopersicum* cultivar Caimanta y *Solanum pimpinellifolium* accesión LA722**

Provista por Ing. Agr. Victoria Cabodevila

## ÍNDICE

---

7 - 18

Article 1 - research

**A MULTIVARIATE APPROACH TO EXPLORE THE GENETIC VARIABILITY IN THE F<sub>2</sub> SEGREGATING POPULATION OF A TOMATO SECOND CYCLE HYBRID**

VARIABILIDAD EN LA POBLACIÓN F<sub>2</sub> SEGREGANTE DE UN HÍBRIDO DE TÓMATE DE SEGUNDO CICLO

Cabodevila V.G., Picardi L.A., Pratta G.R.

---

19 - 26

Article 2 - research

**PREDICCIÓN DEL RENDIMIENTO DE HÍBRIDOS DE MAÍZ (*ZEAMAYS* L.) EN AMBIENTES DE SIEMBRA TARDÍA**

YIELD PREDICTION IN CORN HYBRIDS (*ZEAMAYS* L.) IN LATE SOWING ENVIRONMENTS

Biasutti C.A., Balzarini M.B.

---

27 - 40

Article 3 - research

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GERMOPLASMA DE *MELILOTUS ALBUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR Y SSR**

CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY IN *MELILOTUS ALBUS* GERMPLASM BY ISSR AND SSR MOLECULAR MARKERS

Tomas P.A., Rivero M.N., Tomás M.A.

---

41 - 50

Article 4 - research

**POLIMORFISMOS SEROTONINÉRGICOS: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN DE MAR DEL PLATA, ARGENTINA Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE GENOTIPADO**

SEROTONERGIC POLYMORPHISMS: ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCY DISTRIBUTION IN THE MAR DEL PLATA, ARGENTINA, POPULATION AND COMPARISON OF GENOTYPING METHODS

Perez Maturo J., Videla Y., Di Gerónimo V., Quintana S.

---

51 - 53

Obituary

**DRA. TERESA E. CIACCI ANGELERI DE NEGROTTI (TITA)**

---



## A MULTIVARIATE APPROACH TO EXPLORE THE GENETIC VARIABILITY IN THE F<sub>2</sub> SEGREGATING POPULATION OF A TOMATO SECOND CYCLE HYBRID

## VARIABILIDAD EN LA POBLACIÓN F<sub>2</sub> SEGREGANTE DE UN HÍBRIDO DE TOMATE DE SEGUNDO CICLO

Cabodevila V.G.<sup>1,2,3,\*</sup> Picardi L.A.<sup>1,3,4</sup>, Pratta G.R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Campo Experimental Villarino, CC14 S2125ZAA, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR).

<sup>4</sup> Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR).

\* corresponding author: victoria.cabodevila@unr.edu.ar

### ABSTRACT

Segregating progeny from the tomato Second Cycle Hybrids (SCH) that were obtained from crossing RIL (Recombinant Inbred Lines) allows the detection of new genetic combinations that could increase genetic variability in F<sub>2</sub> populations. The objectives of the present study were to evaluate eleven tomato quality traits in a segregating F<sub>2</sub> population obtained from a SCH and, then, to characterize the molecular diversity by six AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) primer combinations. Different multivariate analyses were used to assess the degree of concordance among these two approaches to detect genetic variability. Sixty-nine F<sub>2</sub> plants were obtained by selfing the SCH (ToUNR18xToUNR1). The parental RIL were derived from an interspecific cross between *S. lycopersicum* cv. Caimanta and the accession LA722 from *S. pimpinellifolium* after five cycles of antagonist and divergent selection for fruit weight and fruit shelf life. Principal Components Analysis (PCA) was applied to these data and we found that the first two components explained 77 % of variability. The molecular characterization showed 62 % of polymorphic bands. The Principal Coordinate Analysis (PCoA) showed that the first ten coordinates explained 75 % of variability. The Generalized Procrustes Analysis (GPA) showed a consensus between morphological and molecular data of 65 %. High values of broad sense heritability (H<sup>2</sup>) were found for all traits together with a high level of molecular polymorphism. The morphological and molecular data showed a high consensus proportion suggesting that it could be possible to detect QTL for these fruit traits exploring this new population.

**Key words:** plant breeding, plant genetic resources, fruit quality, AFLP, multivariate analysis

### RESUMEN

Las generaciones segregantes de Híbridos de Segundo Ciclo (HSC) de tomate, obtenidos por cruzamiento entre RIL (Líneas Endocriadas Recombinantes), constituyen otro acervo genético que permitiría detectar nuevas combinaciones genéticas. Once caracteres cuantitativos de los frutos se evaluaron en una población F<sub>2</sub> obtenida a partir de un HSC y luego se caracterizó la variabilidad molecular mediante seis combinaciones de iniciadores de AFLP (Polimorfismo para Longitud de Fragmentos Amplificados). Se utilizaron sesenta y nueve individuos F<sub>2</sub> obtenidos por autofecundación del HSC (ToUNR18xToUNR1). Las RIL parentales fueron obtenidas a partir de un cruzamiento interespecífico entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y la introducción LA722 de *S. pimpinellifolium* luego de cinco ciclos de selección divergente y antagonista para peso y vida poscosecha de los frutos. El Análisis de Componentes Principales mostró que los primeros dos componentes explicaban 77 % de la variabilidad, la caracterización molecular reveló 62 % de bandas polimórficas, y el Análisis de Coordenadas Principales evidenció que las primeras diez coordenadas explicaban 75 % de la variabilidad. El Análisis de Procrustes Generalizado mostró un consenso entre la información fenotípica y molecular de 65 %. Para la mayoría de los caracteres se encontraron valores altos de heredabilidad en sentido amplio junto con el alto nivel de polimorfismo molecular. Este alto consenso entre la información fenotípica y molecular sugiere que sería posible la detección de QTL para estos caracteres relacionados a calidad de fruto.

**Palabras clave:** mejoramiento vegetal, recursos genéticos vegetales, calidad de fruto, AFLP, análisis multivariado

Fecha de recepción: 20/12/2015  
Fecha de aceptación de versión final: 22/11/2016

## INTRODUCTION

The cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an economically important crop over the world but the migratory process during domestication together with crop improvement have reduced the genetic variability of cultivated germplasm (Blanca *et al.*, 2015). Nevertheless, some increase of genetic variation is present due to the introgression of genes for biotic stress resistance from wild species (Sim *et al.*, 2012). On the other hand several experiments have showed that wild genotypes have also differential fruit quality traits. Zorzoli *et al.* (1998) showed that fruits from wild tomato species (*S. pimpinellifolium*) had longer shelf life than commercial genotypes. Pratta *et al.* (1996) have evaluated different tomato wild and cultivated accessions for fruit shelf life and they have found that the accession LA722 (Tomato Genetic Resources Centre, Davis, USA) was an appropriate genotype to be crossed with an Argentinean cultivar of *S. lycopersicum* (cv. Caimanta) to improve fruit shelf life. From this approach seventeen RIL (Recombinant Inbred Lines) were obtained (Rodríguez *et al.*, 2006). For the present experiment, a Second Cycle Hybrid (SCH) was obtained by crossing some of the selected RIL (Kearsey and Pooni, 1996). As De Toledo *et al.* (1984) have pointed out, these SCH could be an interesting genetic material, with novel genotypes which could have a better performance than the best of the recombinant inbred lines or even the original  $F_1$ . In the segregating progeny of the SCH, new genetic combinations can be found, which can be identified by DNA markers. In this way, molecular and morphological information could be a previous step to QTL detection. In another experiment in tomato, Marchionni Basté *et al.* (2010) found positive General Combining Aptitude values in a diallel analysis for three RIL, including ToUNR18 and ToUNR1. These results have suggested that these RIL could be potential parents to improve important tomato fruit traits such as weight, shelf life, colour, soluble solids content and firmness. The objectives of the present study were to evaluate eleven phenotypic fruit traits in the segregating  $F_2$  population from the SCH (ToUNR18xToUNR1) and, then, to characterize the molecular diversity in this generation by AFLP patterns. We consider that multivariate analyses applied on this information could be the first step to assess putative QTL for the evaluated traits in this genetic material.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant material*

The assay was carried out at the experimental field station "J.F.Villarino", Universidad Nacional de Rosario, Argentina (33° S, 61° W). Sixty-nine  $F_2$  plants were obtained by selfing the SCH (ToUNR18xToUNR1). After five cycles of antagonist and divergent selection for weight and fruit shelf life (Rodríguez *et al.*, 2006), parental RIL, ToUNR1 and ToUNR18 were derived from an interspecific cross between *S. lycopersicum* cv. Caimanta (C, a commercial Argentinean genotype) and *S. pimpinellifolium* LA722 (P, a wild genotype accession, TGRC, Davis, USA). Both RIL and their SCH (the uniform second cycle genotypes, USCG) together with C, P and their interspecific  $F_1$  CxP (the uniform first cycle genotypes, UFCG) were included in the assay as testers.

### *Phenotypic traits*

Fruit traits were evaluated at two different stages: a) breaker (first visible carotenoid accumulation (Giovannoni, 2004)): Weight (W, in g), Height (H, in cm), Diameter (D, in cm), Shape index (S) as the ratio between H and D and fruit Shelf Life (SL, in days) as the number of days from harvest to fruit softening stored at  $25 \pm 3$  °C ; b) ripening (approximately 90 % red surface): Firmness (F) measured on two opposite equatorial sides with a digital firmness tester (Durofel, DFT 100), pH, from the fruit juice, Soluble Solids (SS, in Brix degrees) as the percentage of fructose and glucose, titratable acidity (TA, in g) as the g of citric acid in 100 g of the homogenized juice, the Reflectance Percentage (L) and the Absorbance Index (a/b) as the ratio between the absorbance at 540 nm (a) and the absorbance at 675 nm (b). The L, a, and b traits were measured with a chromameter (Konica-Minolta).

### *Molecular data*

Young leaves were collected from the  $F_2$  generation and all tester plants. DNA was extracted using a commercial kit (Wizard ® Genomic DNA Purification Kit). The DNA quality and concentration was checked on 1 % agarose gel and compared with the  $\lambda$  phage. The AFLP technique was applied following a standard protocol (Bleas *et al.*, 1998) with minor changes. The genomic DNA was digested using two restriction enzymes: *EcoRI*



and *MseI*. For ligation, double-stranded nucleotide adapters complementary to the restriction sites (*MseI* and *EcoRI* Adapter) were used. The pre-amplification was made using *MseI*+1 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') and *EcoRI*+1 (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'). Six AFLP primers combinations were used for the selective amplification. These combinations were selected because they produced high number of bands and a large percentage of polymorphism in the testers (Cabodevila *et al.*, 2013). The combinations were:

F: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3' /  
5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3';  
J: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-  
3' / 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3';  
H: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-  
3' / 5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3';  
HH: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-  
3' / 5'-GACTGCGTACCAATTCATT-3'; II:  
5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' / 5'-  
GACTGCGTACCAATTCATT-3' and JJ:  
5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3' / 5'-  
GACTGCGTACCAATTCATT-3'. A PCR touchdown  
was used. Separation of the amplification fragments was  
done in 6 % polyacrylamide gels and the visualization  
was made using silver staining (NO<sub>2</sub>Ag).

#### Data analysis

The normality of phenotypic traits distribution was verified by the Shapiro-Wilk's test. Parental means were first compared between them and, then, each of them was compared with their hybrid using the Duncan's test. The dominance degree (d/a) was calculated in UFCG and in USCG for those traits that showed significant differences between parents. Also phenotypic distribution was explored for all quantitative traits. Broad sense heritability (H<sup>2</sup>) was estimated according to Mather and Jinks (1971), to assess the degree of genotypic component in this new phenotypic variance. A Principal Component Analysis (PCA) was performed for the F<sub>2</sub> individuals including all morphological fruit traits. Following Pratta *et al.* (2000), data were not standardized. Molecular characterization included the total number of bands, the polymorphic bands and the *de novo* bands; following, the degree of polymorphism (in percentage) was calculated. We considered that F<sub>1</sub> *de novo* bands were those which were either present (1) or absent (0) in both RIL but either

absent or present, respectively, in the SCH. Bands either absent or present in both RIL and in the SCH, but with 10 % or more of either presence or absence in the F<sub>2</sub>, were considered F<sub>2</sub> *de novo* bands. The  $\chi^2$  test was used to verify the Mendelian segregation of the polymorphic bands. Bands were tested under the 3:1 segregation hypothesis (3 present: 1 absent or 3 absent: 1 present, for presence in one of the RIL and in the F<sub>1</sub>, or absence in one of the RIL and also in the F<sub>1</sub>). The *de novo* bands in F<sub>1</sub> were contrasted to a 1:1 segregation. The *de novo* bands in F<sub>2</sub>, were contrasted to a 3:1 segregation (3 present: 1 absent or 3 absent: 1 present for more presence than absence or more absence than presence in F<sub>2</sub>). A Principal Coordinate Analysis (PCoA) was carried out using all the bands that had a Mendelian segregation and with the Jaccard (1-S) distance (Jaccard, 1901). A Generalized Procrustes Analysis (GPA) was performed using the Gower distance (Gower, 1966; 1975), in order to measure the consensus between the morphological and molecular information. The PCA, PCoA and GPA were performed using InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

## RESULTS

Significant differences between C and P genotypes were found for all fruit traits, excepting SS and pH traits. Also in the UFCG group significant differences were found for L, TA, D, H, W and F traits between these parents and their interspecific CxP F<sub>1</sub> progeny (see Figure 1 Sections A and B). As it can be seen in Table 1, complete dominance was observed for a/b, S and SL traits, whereas partial dominance was observed for TA, D, H, W and F. Only for the L trait a negative overdominance was detected.

Regarding to the USCG, significant differences between the parental RIL (ToUNR18 and ToUNR1) were observed for L, SS, TA, D, H and S traits. Only for H trait a significant difference was observed between these parental RIL and their F<sub>1</sub> (ToUNR18xToUNR1) (Figure 1 Sections A and B). Hence, the dominance degree in the USCG indicated a complete dominance for L, SS, TA, D, and S. A negative overdominance was found for H.

Transgressive segregation was observed for all traits in the F<sub>2</sub> progeny as it can be seen in Figure 1 Sections A and B. As Singh *et al.* (2013) have pointed out, transgressive segregation is an indicator of the broadening of the genetic variance.

The C and P genotypes, which had the highest and lowest values for the W, D and H traits, were never surpassed by any  $F_2$  individual. For the SL, F and S traits, we found  $F_2$  genotypes that surpassed the average values of genotype C; for the TA trait, some genotypes had values below P; for the L trait, some genotypes had values above CxP and, finally, for the a/b trait, some genotypes had values below P and CxP.

All traits were normally distributed in the  $F_2$ , except for the TA trait. This trait was transformed for this analysis by the  $\text{Log}_{10}$ . Broad sense heritability ( $H^2$ ) values for all traits are shown in Table 1. The TA, SS and pH traits had the higher values (0.98, 0.94 and 0.90, respectively).

The segregating  $F_2$  generation analysed by PCA for all fruit traits showed that the first two components accounted for 77 % of the variation (PC1= 41 %, PC2= 36 %). The PC1 was mainly explained by the F trait and the PC2 by the SL and W traits (Figure 2a). The cophenetic correlation coefficient was 0.93. The molecular characterization

showed 68 out of a total of 110 bands were polymorphic (62 %). A section of a polyacrylamide gel is shown in Figure 3. There were 51 *de novo* bands only in the second cycle genotypes: 25 of them were *de novo* in the  $F_1$  (bands that were present in the RIL and absent in the  $F_1$ , or absent in the RIL and present in the  $F_1$ ) and the other 26 bands were *de novo* in the  $F_2$  (either present or absent in the RIL and  $F_1$ , and with 10 % or more of absence or presence in the  $F_2$ ). Twenty-nine of the 68 polymorphic bands adjusted to the expected Mendelian segregation (43 %). The PCoA using the Jaccard distance (1-S) for the six AFLP primer combinations and the bands with the expected segregation showed a large variation (Figure 2b); as a consequence, ten coordinates were necessary to explain 75 % of the variability (see the wide distribution of genotypes in Figure 2b).

The PCA and the PCoA analysis allowed to carry out the joint analysis (GPA). The first four components explained 77 % of the variability (CP1= 35 %, CP2= 22 %, CP3= 13 %, CP4= 6 %), with a consensus of 65 % (Figure 4).

**Table 1.** Environmental ( $\sigma^2E$ ), genotypic ( $\sigma^2G$ ) and phenotypic variances ( $\sigma^2P$ ), broad sense heritability ( $H^2$ ) and dominance degree (d/a) for quantitative fruit traits. D: Diameter; H: Height; W: Weight; S: Shape; SL: Shelf Life; F: Firmness; a/b: Absorbance Index; L: Reflectance Percentage; SS: Soluble Solids; TA: Titratable Acidity.

	$\sigma^2E$	$\sigma^2G$	$\sigma^2P$	$H^2$	d/a	
					UFCG	USCG
D	0.2888	0.1022	0.3910	0.26	-0.63	-1.00 (L18)
H	0.2195	0.1490	0.3685	0.40	-0.38	-2.78
W	48.4080	10.6337	59.0417	0.18	-0.90	-
S	0.0175	0.0036	0.0211	0.17	1.00 (P)	-1.00 (L1)
SL	41.8047	31.7570	73.5617	0.43	1.00 (P)	-
F	47.5928	55.5638	103.1566	0.54	-0.09	-
a/b	0.0167	0.0187	0.0354	0.53	1.00 (P)	-
L	2.0233	3.1314	5.1547	0.61	-2.30	-1.00 (L1)
pH	0.0075	0.0657	0.0732	0.90	-	-
SS	0.1108	1.7087	1.8195	0.94	-	1.00 (L1)
TA	0.0004	0.0188	0.0192	0.98	-0.48	1.00 (L1)

UFCG: Uniform First Cycle Genotypes; USCG: Uniform Second Cycle Genotypes; (P): the  $F_1$  does not differ from S. *pimpinellifolium* accession LA722; (L1): the  $F_1$  does not differ from RIL ToUNR1; (L18): the  $F_1$  does not differ from RIL ToUNR18; -: the parents do not differ between them.

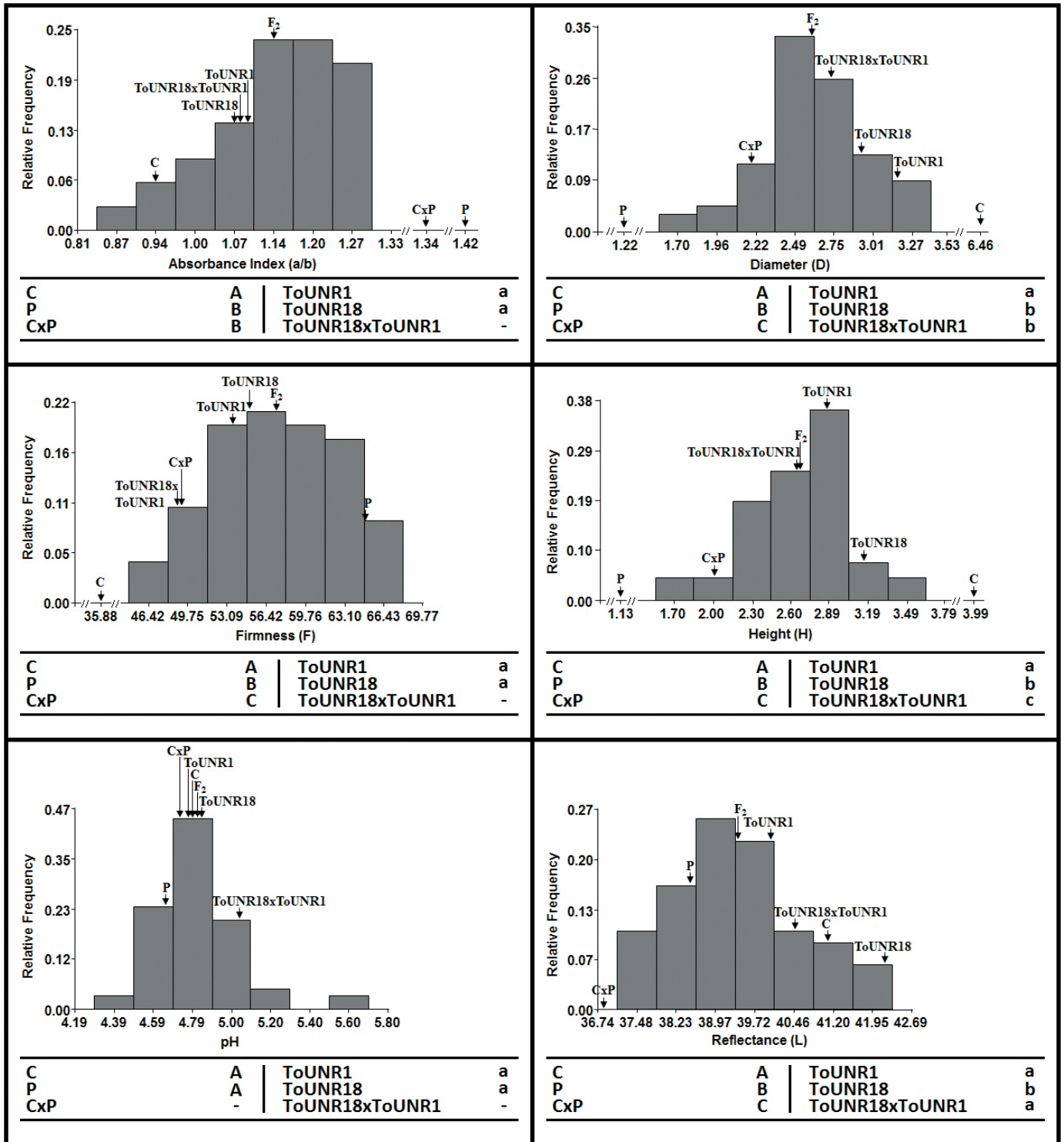


Figure 1 (Section A). Histograms for quantitative fruit traits in the F<sub>2</sub> population

The means for *Solanum lycopersicum* cv. Caimanta (C), *S. pimpinellifolium* accession LA722 (P), F1 CxP, ToUNR1, ToUNR18, SCH (ToUNR18xToUNR1) and F2 from this SCH are shown in the graphics. Different uppercase letters mean significant differences between UFCG by Duncan's test ( $p < 0.05$ ). Different lowercase letters mean significant differences between USCG by Duncan's test ( $p < 0.05$ ).

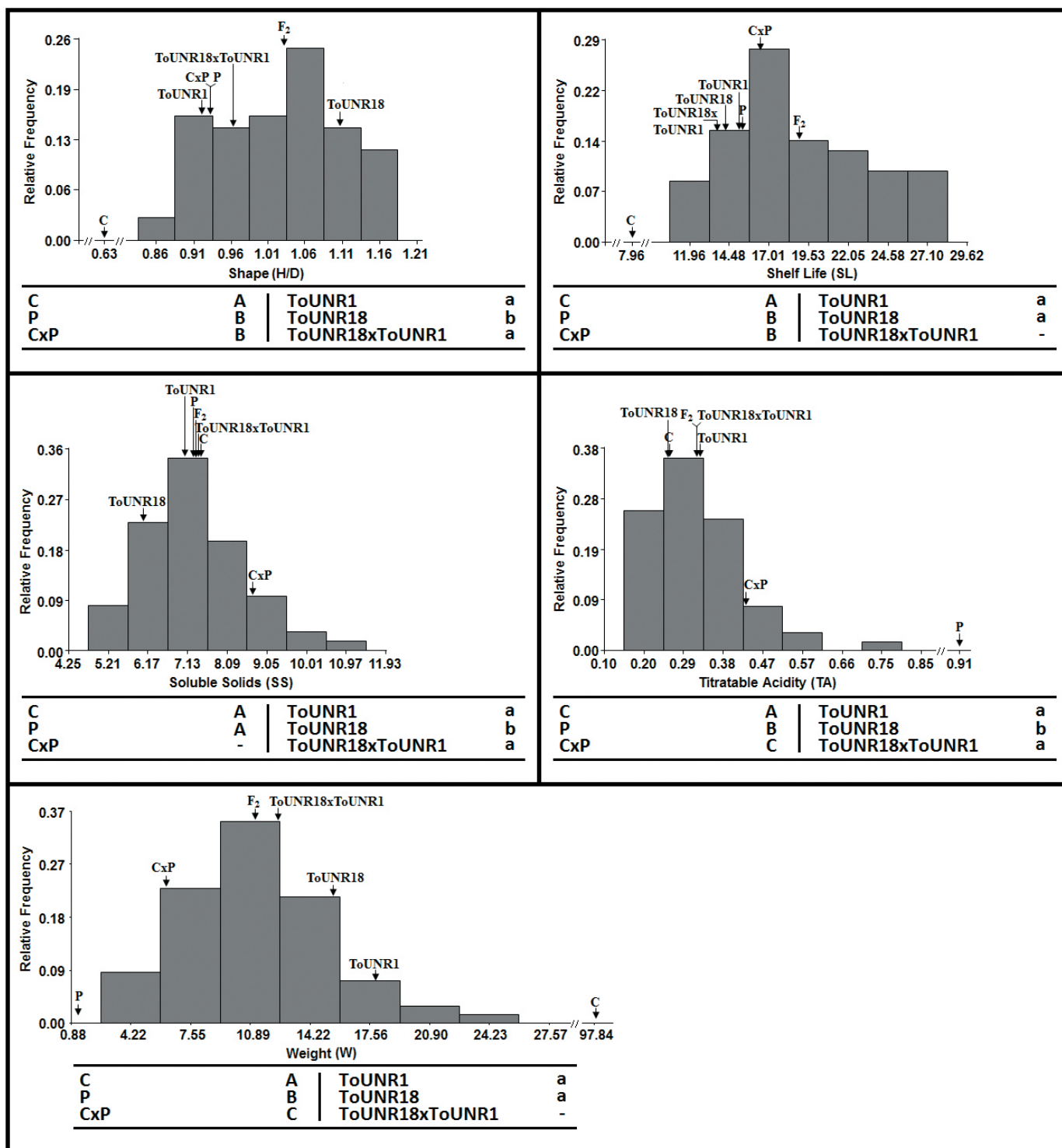
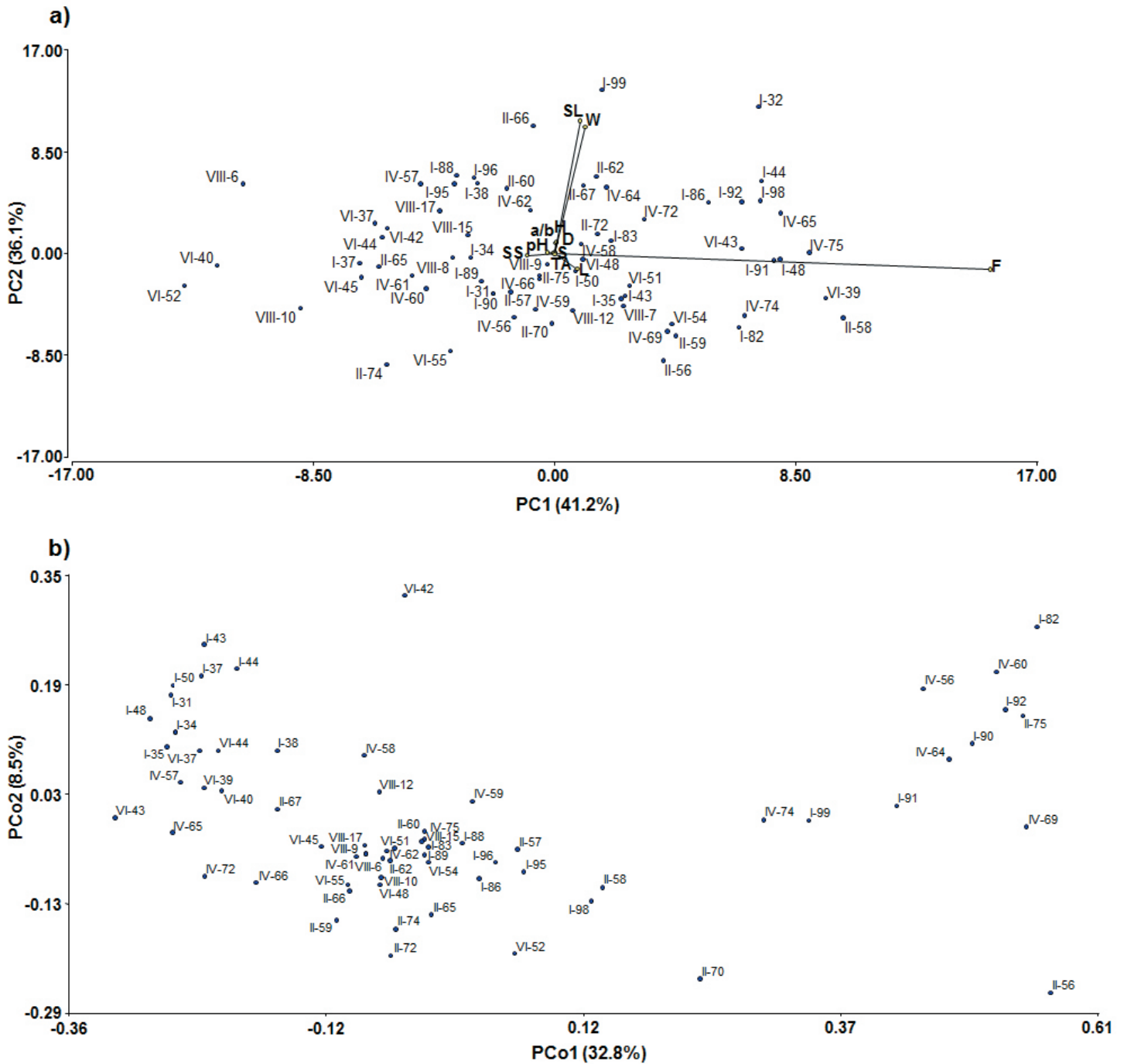


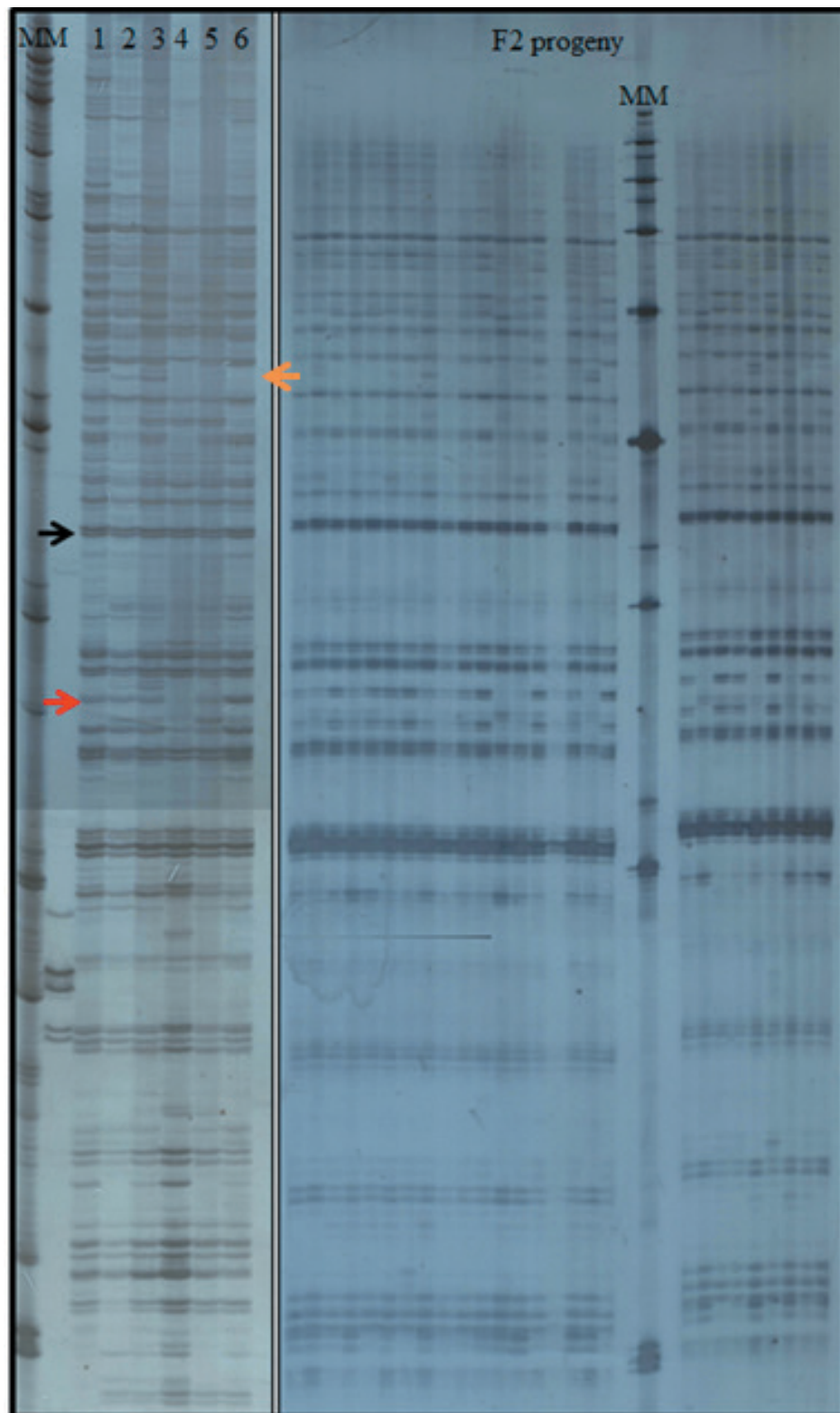
Figure 1 (Section B). Histograms for quantitative fruit traits in the F<sub>2</sub> population

The means for *Solanum lycopersicum* cv. Caimanta (C), *S. pimpinellifolium* accession LA722 (P), F<sub>1</sub>, CxP, ToUNR1, ToUNR18, SCH (ToUNR18xToUNR1) and F<sub>2</sub> from this SCH are shown in the graphics. Different uppercase letters mean significant differences between UFCG by Duncan's test (p<0.05). Different lowercase letters mean significant differences between USCG by Duncan's test (p<0.05).



**Figure 2.** Biplot of: a) first two Principal Components (PC1 and PC2) of the Principal Component Analysis (PCA); b) first two Principal Coordinates (PCo1 and PCo2) of the Principal Coordinate Analysis (PCoA). Reflectance Percentage (L), Absorbance Index (a/b), Soluble Solids (SS), Height (H), Shape (S), Shelf Life (SL), Diameter (D), Weight (W), Titratable Acidity (TA) and Firmness (F).

In b) VIII-7 and VIII-8 genotypes are at the same point than VIII-9, and I-32 genotype is at the same point than? I-34.



**Figure 3.** Two sections of a polyacrylamide gel of UFCG, USCG and some of the  $F_2$  progeny for the J combination.

MM: Molecular marker; 1: *S. lycopersicum* cv. Caimanta (C); 2: *S. pimpinellifolium* accession LA722 (P); 3: CxP; 4: ToUNR1; 5: ToUNR18; 6: SCH: ToUNR18xToUNR1. Black arrow=monomorphic band (present in the UFCG, USCG and  $F_2$  genotypes); red arrow= polymorphic band (present in UFCG, ToUNR18, SCH: ToUNR18xToUNR1 and in some  $F_2$  genotypes); orange arrow=*de novo* band in  $F_2$  (absent in USCG and present in some  $F_2$  genotypes).

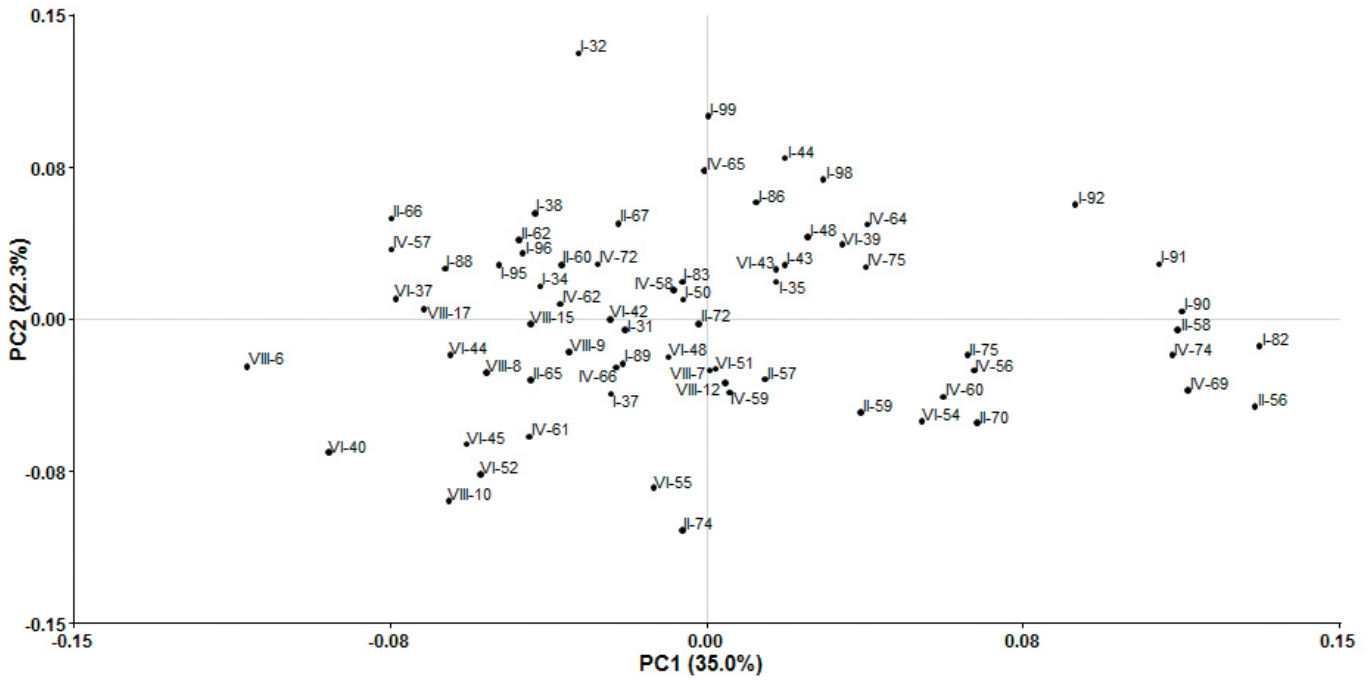


Figure 4. Consensus for the Generalized Procrustes Analysis (GPA) for eleven quantitative fruit traits and six AFLP primer combinations in the  $F_2$  progeny .

DISCUSSION

In the present study, the  $F_2$  population of a SCH among RIL, ToUNR18 and ToUNR1 was morphologically and molecularly characterized. The study of the association between morphological and molecular data is a first step to evaluate the level of agreement between the two types of data for eventual QTL detection. According to the results of the genetic analyses, complete and partial dominance were the more frequent types of gene action for these traits in the UFCG. Overdominance was only detected for the L trait. Similar results were observed in USCG, where complete dominance was observed in this group for L, SS, TA, D, and S, and overdominance for H. In both groups, UFCG and USCG, aditivity gene action seems to be absent and overdominance was scarce. Consequently in both, USCG and UFCG, the most frequent type of gene action was non-additive (including complete dominance, partial dominance and overdominance). Possibly, changes in type of gene action over generations for different traits could be due to the effect of selection, recombination and

chromosomal rearrangement, which could generate novel genotypic variation. Similar results were found by Liberatti *et al.* (2013) in another three SCH, where the most frequent type of gene action was non-additive either with complete dominance, partial dominance or overdominance.

Transgressive segregation was observed in the  $F_2$  population for all traits. Broad sense heritability exhibited high values for all traits, with the highest values for pH, SS and TA, and the lowest values for S and W (the method utilized to estimate this parameter does not allowed to obtain the standard error and, in this way, to have more data about the reliability of these estimations).

Blears *et al.* (1998) indicated that one of the main advantage of AFLP markers is the number of *loci* detected per reaction. In this study, the six AFLP primer combinations revealed 110 bands, 68 of which were polymorphic (62 %). There were 51 *de novo* bands considering only the second cycle genotypes: 25 of them were *de novo* in the  $F_1$  and the other 26 bands were *de novo* in the  $F_2$ ; these bands could account for genetic changes occurring upon the crossing between cultivated and wild germplasm and their derived generations (Ercolano *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2005; Vela *et al.*, 2011; Paule *et al.*, 2012).

The PCoA showed that ten coordinates were necessary to explain 75 % of variability and, finally, the combination of the morphological and molecular data, performed by PGA, showed 65 % of consensus. Mahuad *et al.* (2013) found 75 % of consensus between 11 quantitative traits and molecular data (SRAP) for 18 uniform genotypes (containing 10 SCH, five RIL and parentals of these RIL), suggesting that the GPA allowed the verification of the consensus between the variability of phenotypic traits and molecular markers. On the other hand, Bramardi *et al.* (2005) showed that General Procrustes Analysis was the most precise technique to cluster entries of cucumber (*Cucumis sativus* L.). In the tomato F<sub>2</sub> generation under study, the PCA demonstrated that the first two components explained 77 % of the observed variability. The correlation between molecular and morphological diversity indicate linkage disequilibrium between molecular markers and those genes that control morphological traits (Baranger *et al.*, 2004). The SCH may be unique genotypes which are capable of outperforming the best of the recombinant inbred lines or the original F<sub>1</sub>. As we have shown, a high level of molecular polymorphism was detected in this experiment; moreover, the morphological and molecular data showed a high consensus proportion. Hence QTL detection in the SCH segregating generation through the application of multivariate techniques would be a good first approach for identifying chromosome regions controlling quantitative traits.

## BIBLIOGRAPHY

- Baranger A., Aubert G., Arnau G., Lainé A.L., Deniot G., Potier J., Weinachter C., Lejeune-Hénaut I., Lallemand J., Burstin J. (2004) Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1309-1321.
- Blanca J., Montero-Pau J., Sauvage C., Bauchet G., Illa E., Díez M.J., Francis D., Causse M., van der Knaap E., Cañizares J. (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16: 257.
- Bleas M.J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T. (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 21: 99-114.
- Bramardi S.J., Bernet G.P., Asíns M.J., Carbonell E.A. (2005) Simultaneous agronomic and molecular characterization of genotypes via the generalised procrustes analysis: an application to cucumber. *Crop Sci.* 45: 1603-1609.
- Cabodevila V.G., Cachiarelli P., Pratta G.R. (2013) AFLP characterization of uniform tomato genotypes and selection of primers that maximize the molecular polymorphism. *Biocell* 37 (2): A94.
- De Toledo J.F.F., Pooni H.S., Jinks J.L. (1984) Predicting the properties of second cycle hybrids produced by intercrossing random samples of recombinant inbred lines. *Heredity* 53 (2): 283-292.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2016) InfoStat versión 2016 Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ercolano M.R., Carputo D., Li J., Monti L., Barone A., Frusciante L. (2004) Assessment of genetic variability of haploids extracted from tetraploid ( $2n = 4x = 48$ ) *Solanum tuberosum*. *Genome* 47: 633-638.
- Giovannoni J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16: S170-S180, supplement 2004.
- Gower J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Gower J.C. (1975) Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33-51.
- Jaccard P. (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 37: 547-579.
- Kearsey M.J., Pooni H.S. (1996) Applications. In: *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 302-334.



- Liberatti D.R., Rodriguez G.R., Zorzoli R., Pratta G.R. (2013) Tomato second cycle hybrids differ from parents at three levels of genetic variation. *Int. J. Plant Breed.* 7 (1): 1-6.
- Mahuad S.L., Pratta G.R., Rodriguez G.R., Zorzoli R., Picardi L.A. (2013) Preservation of *Solanum pimpinellifolium* genomic fragments in recombinant genotypes improved the fruit quality of tomato. *J. Genet.* 92: 195-203.
- Marchionni Basté E., Liberatti D.R., Mahuad S.L., Rodriguez G.R., Pratta G.R., Zorzoli R., Picardi L.A. (2010) Diallel analysis for fruit traits among tomato recombinant inbred lines derived from an interspecific cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *J. App. Hort.* 12 (1): 21-25.
- Mather K., Jinks J.L. (1971) *Biometrical Genetics*. London, Chapman and Hall.
- Paule J., Scherbantin A., Dobeš C. (2012) Implications of hybridisation and cytotypic differentiation in speciation assessed by AFLP and plastid haplotypes - a case study of *Potentilla alpicola* La Soie. *BMC Evol. Biol.* 12: 132.
- Pratta G.R., Zorzoli R., Picardi L.A. (1996) Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Hort. Arg.* 15: 25-32.
- Pratta G.R., Zorzoli R., Picardi L.A. (2000) Multivariate analysis as a tool for measuring the stability of morphometric traits in *Lycopersicon* plants from *in vitro* culture. *Genet. Mol. Biol.* 23 (2): 479-483.
- Rodríguez G.R., Pratta G.R., Zorzoli R., Picardi L.A. (2006) Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131 (5): 651-656.
- Sim S.C., Van Deynze A., Stoffel K., Douches D.S., Zarka D., Ganal M.W., Chetelat R.T., Hutton S.F., Scott J.W., Gardner R.G., Panthee D.R., Mutschler M., Myers J.R., Francis D.M. (2012) High-density SNP genotyping of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of genetic variation due to breeding. *PLoS ONE* 7 (9): 1-7.
- Singh M., Rana M.K., Kumar K., Bisht I.S., Dutta M., Gautam N.K., Sarker A., Bansal K.C. (2013) Broadening the genetic base of lentil cultivars through inter-sub-specific and interspecific crosses of *Lens* taxa. *Plant Breed.* 132: 667-675.
- Vela D., García Guerreiro M.P., Fontdevila A. (2011) Adaptation of the AFLP technique as a new tool to detect genetic instability and transposition in interspecific hybrids. *BioTechniques* 50: 247-250.
- Wang Y.M., Dong Z.Y., Zhang Z.J., Lin X.Y., Shen Y., Zhou D., Liu B. (2005) Extensive *de novo* genomic variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Genetics* 170: 1945-1956.
- Zorzoli R., Pratta G.R., Picardi L.A. (1998) Efecto de los mutantes nor y rin y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana* 13: 12-19.



## PREDICCIÓN DEL RENDIMIENTO DE HÍBRIDOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN AMBIENTES DE SIEMBRA TARDÍA

## YIELD PREDICTION IN CORN HYBRIDS (*Zea mays* L.) IN LATE SOWING ENVIRONMENTS

Biasutti C.A.<sup>1\*</sup>, Balzarini M.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mejoramiento Genético Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, C.C. 509, 5000 Córdoba.

<sup>2</sup>Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, C.C. 509, 5000 Córdoba.

\* corresponding author: biasutti@agro.unc.edu.ar

---

### ABSTRACT

Accurate prediction of the phenotypical performance of untested single-cross hybrids allows for a faster genetic progress of the breeding pool at a reduced cost. Yield data of maize hybrids were employed to predict the performance of new untested hybrids in late sowing environments. Different groups of predictor hybrids were formed using both data from high and low relatedness between predictors and predicted hybrids and by employing data from low and high yielding environments. A new group of hybrids were formed and evaluated in field trials to validate the predictions. The effectiveness of the predictions was investigated by means of the correlation coefficient between predicted and observed yield values. The best predictions of untested new hybrids were reached by using maximum relatedness information combined with data obtained in the best yielding environments.

**Key words:** maize, relationship, yield, BLUP

### RESUMEN

La predicción precisa del comportamiento de híbridos de maíz no evaluados a campo permitirá un mayor progreso genético y menores costos en programas de mejoramiento genético. Datos de rendimiento de híbridos evaluados a campo se emplearon para predecir el comportamiento de nuevos híbridos en ambientes de siembra tardía. Se conformaron grupos de híbridos predictores de manera de maximizar y minimizar las relaciones de parentesco entre los híbridos predictores y aquellos a predecir y, por otra parte, utilizar valores de predicción obtenidos en ambientes de alto rendimiento y bajo rendimiento a fin de investigar la influencia de estos factores sobre la eficiencia de las predicciones. A fin de validar las predicciones se tomó un grupo de híbridos cuyo rendimiento en grano fue evaluado a campo, pero que no formaron parte del grupo inicial. Se calcularon los coeficientes de correlación entre los valores predichos y los observados para rendimiento con el fin de evaluar la efectividad de la predicción realizada. La mejor predicción de los híbridos no evaluados, se alcanzó utilizando la máxima relación de parentesco entre los híbridos combinada con datos obtenidos en el ambiente de mayor rendimiento promedio.

**Palabras clave:** maíz, parentesco, rendimiento, BLUP

---

Fecha de recepción: 2/11/2016  
Fecha de aceptación de versión final: 2/03/2017

## INTRODUCCIÓN

Para la obtención de cultivares híbridos, los mejoradores de maíz desarrollan en forma ininterrumpida gran cantidad de líneas endocriadas a partir de poblaciones F2 generadas por el reciclaje de líneas elite o líneas de segundo ciclo, a partir de retrocruzas o de poblaciones con alta variabilidad genética (Hallauer, 1990). Este proceso de endocria y selección, ha sido facilitado y acelerado en años recientes por la utilización de metodologías que permiten acortar los tiempos para la obtención de líneas homocigotas en maíz, como por ejemplo, la técnica de doble haploides (Seitz, 2005). Esto lleva a que exista un gran número de híbridos potenciales a obtener y probar experimentalmente a campo, sobre todo en lo que respecta a su potencial de rendimiento. Sin embargo, los mejoradores no pueden prácticamente evaluar todas las combinaciones simples entre las líneas endocriadas que disponen, debido que el número de cruzas posibles aumenta drásticamente al aumentar el número de líneas disponibles. No obstante, es posible evaluar un número considerablemente menor de híbridos y, en base al rendimiento de estos híbridos, se puede intentar predecir el rendimiento de los restantes híbridos no evaluados. Esto se puede lograr mediante el empleo de la predicción lineal insesgada de mínima varianza o BLUP (Henderson, 1975; 1984), la cual ha sido indicada por poseer una satisfactoria precisión en las predicciones (Piepho *et al.*, 2008). Otro factor muy importante a tener en cuenta es que los mejoradores rara vez cuentan con bases de datos balanceados. Frecuentemente las líneas elite son probadas en muchas combinaciones, mientras que otras aparecen en pocos pedigrís de híbridos. En un típico programa de mejoramiento de maíz, grupos de híbridos simples son evaluados en diferentes ensayos de rendimiento, en diferentes localidades y en diferentes años. Los híbridos evaluados cambian constantemente, dado que los de pobre rendimiento son descartados y nuevos híbridos son incorporados a los ensayos de evaluación.

Bernardo (1994; 1995; 1996a) ha indicado el empleo de BLUP como una metodología satisfactoria para la predicción de híbridos simples en maíz. Para la estimación de la precisión de las estimaciones de rendimiento, Bernardo (1995) utilizó la validación cruzada en base a la elección al azar de grupos híbridos predictores. Basados en los rendimientos de estos  $p$  híbridos predictores, los rendimientos de los restantes  $(n - p)$  híbridos fueron predichos.

Bernardo (1996a) también evaluó la bondad de las predicciones mediante la eliminación del primer híbrido de la base de datos,  $n$  híbridos simples, y predicho a partir de los restantes  $n-1$  híbridos simples. Similarmente evaluó las predicciones para el 2do, 3ro y restantes  $n$ -ésimos híbridos de la base de datos empleada, mediante los  $n-1$  híbridos restantes. Este autor encontró correlaciones entre los valores predichos y los observados para rendimiento en grano, entre 0,583 y 0,749, a partir de un set de 67 híbridos simples (Bernardo, 1995) y de 0,426 a 0,762, con una base de 4.099 híbridos simples (Bernardo, 1996a). Estos resultados sugirieron que las estimaciones basadas en BLUP pueden ser empleadas rutinariamente en la identificación de cruzas simples superiores antes de ser evaluadas a campo (Bernardo, 1996a).

Esta estrategia de validación cruzada ha sido objetada dado que no reflejaría las circunstancias reales de un programa de mejora, donde una nueva línea podría ser cruzada solamente con unas pocas líneas probadoras y no con todas las disponibles (Schrag *et al.*, 2007).

Maenhout *et al.* (2008) utilizaron un esquema de validación cruzada en el cual se simulaba la falta de información de uno o de los dos parentales de un nuevo híbrido. Sin embargo estos procedimientos no tomaban en cuenta la ocurrencia de la interacción genotipo x ambiente, es decir, la correlación entre los valores predichos y observados puede ser influenciada por valores genotípicos marginales dados por un ambiente particular. Para mejorar esto Maenhout *et al.* (2010) utilizaron un ensayo adicional de validación a campo constituido por híbridos evaluados en un ensayo perfectamente balanceado.

De acuerdo a Bernardo (1995) para utilizar la técnica de BLUP para predicciones se necesita información relativa a: datos del comportamiento de híbridos relacionados y estimaciones de las relaciones de parentesco entre los genotipos evaluados. Incluso, se ha demostrado que aún con mediciones incompletas y/o erróneas del coeficiente de coancestría la técnica de BLUP es lo suficientemente robusta como para efectuar eficientemente las predicciones de comportamiento (Bernardo, 1996b).

En la mayoría de las predicciones analizadas se utilizaron bases de datos cuyos valores de rendimiento eran promedios de numerosos híbridos ( $>100$ ) y en base al rendimiento medio observado en combinación de ambientes, años y localidades. Sin embargo, es de interés investigar cómo puede afectar la predicción el empleo de datos provenientes de diferentes ambientes.

En la zona centro norte de la provincia de Córdoba, en la última década, las lluvias de primavera han sido erráticas y mayormente escasas. Debido a esto, la elección de la fecha de siembra tardía en el cultivo de maíz se está generalizando como una herramienta para diversificar el período crítico, para sembrar en lotes con poca agua útil a la siembra o para sembrar ambientes que por su estructura tienen poca capacidad de retener agua. Las zonas donde más se ha generalizado la fecha tardía como alternativa a la fecha temprana son: el norte de Córdoba, La Pampa, San Luis, Suroeste de Córdoba y Oeste de Bs. As. (Dekalb, 2010).

El objetivo de este trabajo fue estimar la precisión de las predicciones empleando un reducido número de híbridos predictores y cuyo rendimiento fue evaluado en ambientes de siembra tardía (diciembre) con diferente potencial de rendimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Cuarenta y nueve híbridos simples de maíz se dispusieron en ensayos en bloques completos aleatorizados, con dos repeticiones, durante cuatro ciclos agrícolas (ambientes 1 al 4). Los híbridos fueron obtenidos mediante la cruce de líneas obtenidas por autofecundación y selección siguiendo el patrón heterótico flint x dentado. Los ambientes de evaluación corresponden a la localidad del Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Córdoba (31° 29' S; 64° 00' W), comprendida en un área marginal para el cultivo de maíz (INTA, 1980). La época de siembra fue durante la segunda quincena del mes de diciembre para todos los ensayos. El número de híbridos experimentales evaluados fue variable a lo largo de las campañas, ya que algunos fueron descartados por pobre desempeño y, además, se fueron agregando nuevos híbridos experimentales, fundamentalmente en los dos últimos ambientes de evaluación.

El tamaño de parcela en cada ensayo fue de 2 surcos de 5 m de longitud, con una distancia entre surcos de 0,7 m. La distancia entre plantas dentro del surco fue en todos los casos de 0,25 m. Se sembraron 2 semillas por golpe, raleándose al estado de 2/3 hojas a una planta por golpe. Se aplicó un herbicida de pre-emergencia (atrazina) para control de las malezas. Después de la emergencia las malezas se controlaron manualmente. El rendimiento en grano se calculó en base al peso total de la parcela ajustado a un contenido de humedad del 14 %.

Para la estimación del grado de parentesco entre los híbridos se utilizó el coeficiente de coancestría de acuerdo a la metodología propuesta por Falconer (1981) empleando el procedimiento ProcInbreed de SAS (2004).

Para el cálculo de las predicciones se utilizó la ecuación (Bernardo 1995):

$$Y_{nt} = CV^{-1} (Y_t - X\beta)$$

Donde:  $Y_{nt}$  es el vector de méritos genéticos de híbridos no ensayados a campo (no evaluados);  $C$  es la matriz de covarianza entre los híbridos presentes en el experimento y los potenciales o no ensayados;  $V^{-1}$ : Matriz de varianzas y covarianzas fenotípicas de los híbridos ensayados a campo;  $Y_t$  es el vector de valores fenotípicos de los híbridos ensayados; y  $X\beta$ , la esperanza de rendimiento para los híbridos ensayados. Luego  $(Y_t - X\beta)$  representa los efectos de los híbridos ensayados.

Se empleó el procedimiento IML de SAS (2004) para el cómputo de las diferentes matrices involucradas en la predicción de los valores de rendimiento de los híbridos no testeados. Los grupos de híbridos predictores (10 híbridos por grupo) se eligieron de manera de maximizar y minimizar las relaciones de parentesco entre los híbridos predictores y aquellos a predecir y, por otra parte, utilizar valores de predicción obtenidos en ambientes de alto rendimiento (3ro y 4to ambientes) y de ambientes de bajo rendimiento (1ro y 2do ambientes) a fin de investigar la influencia de estos factores sobre la eficiencia de las predicciones.

A fin de validar las predicciones se tomó un grupo de 9 híbridos (Identificados con 1 a 9) cuyo rendimiento en grano fue evaluado a campo, pero que no formaron parte del grupo inicial de los 49 híbridos. Estos híbridos fueron evaluados a campo las campañas 2012 y 2013, en ensayos en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Los ensayos se realizaron en el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. El rendimiento de estos híbridos, ajustado al 14 % de humedad, fue el realmente observado a campo y sobre el que se validó la predicción realizada en base al grupo de 49 híbridos iniciales.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los valores predichos y los observados para rendimiento con el fin de evaluar la efectividad de la predicción realizada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de correlación entre los valores predichos y los observados a campo variaron de acuerdo a la magnitud de las relaciones de coancestría y si se utilizaron como predictores valores obtenidos en ambientes de bajo o alto rendimiento (Figura 1). La correlación entre los valores predichos y observados varió entre 0,39 a 0,51, según se utilizaran cruza con el menor o mayor grado de parentesco entre los grupos de híbridos predictores y aquellos a predecir (Figuras 2 y 3). Al emplearse los valores de rendimiento de los híbridos predictores obtenidos en ambientes de altos rendimientos (ambientes 3 y 4), valor medio de los híbridos predictores 88,84 q/hq (Figura 4), y bajo rendimiento (ambientes 1 y 2), valor medio de los híbridos predictores 66,44 q/ha (Figura 5), las correlaciones entre los valores predichos y observados fueron de 0,53 y 0,48 respectivamente.

Estos valores de correlación son de una menor variabilidad comparados con el rango de correlaciones entre valores predichos y observados para rendimiento, 0,13 a 0,76 reportados por Bernardo (1996a, b). Esto es razonable si se tiene en cuenta la disparidad en el número de híbridos evaluados, 49 híbridos evaluados en este estudio versus 4.099 híbridos evaluados por el autor mencionado. Este autor examinó cruza entre 10 grupos heteróticos, de los cuales el que mostró el menor coeficiente de correlación (0,13) correspondió al grupo con menor número de híbridos evaluados (62 híbridos). Se comprobó, además, que cuando se utilizan líneas parentales de híbridos de las cuales no hay información disponible, es decir información de su comportamiento en cruza relacionadas, los coeficientes de correlación entre genotipos predictores y aquellos a predecir caen por debajo de 0,5 (Bernardo, 1996b). Esto se comprobó en este trabajo al obtener un coeficiente de correlación de 0,39 cuando se utilizaron híbridos predictores con la menor relación de coancestría con los híbridos a predecir.

El coeficiente de coancestría promedio entre los híbridos predictores y aquellos a predecir fue de 0,141 en el caso de la menor similitud entre los híbridos y de 0,152 al considerar la mayor similitud entre ambos grupos de híbridos. Por otra parte, las relaciones promedio entre los híbridos empleados como predictores fueron de 0,083 y de 0,103, respectivamente. Estos bajos coeficientes no impidieron obtener moderados coeficientes de correlación (0,48 y 0,53) entre las cruza evaluadas y aquellas a predecir.

Sin embargo una pequeña diferencia en la magnitud del coeficiente de coancestría (0,01), entre la mayor y menor relación posible entre los híbridos predictores y aquellos a predecir, permitió elevar el coeficiente de correlación de 0,39 a 0,51.

Se ha argumentado que el coeficiente de coancestría tiende a aumentar cuando se cruzan líneas derivadas del reciclaje de líneas elite o líneas de segunda generación, donde las mejores líneas son cruzadas entre sí para formar nuevas poblaciones base para el desarrollo de nuevas líneas endocriadas. Como en este estudio la mayoría de las líneas no fueron obtenidas a partir de líneas de segunda generación, si no por la autofecundación de poblaciones mejoradas por selección recurrente, esos coeficientes están acordes a este material (Bernardo, 1996b).

A pesar de que los coeficientes de correlación encontrados en este estudio son menores que los hallados por otros autores (Bernardo, 1995; 1996a), debe tenerse en cuenta que se examinó un número reducido de híbridos (49) y que las relaciones de parentesco entre ellos eran bajas comparadas con los estudios mencionados. Maenhout et al. (2010) remarcaron que el empleo de bases de datos extensas no necesariamente implica una mejor precisión en la predicción, siempre y cuando los híbridos utilizados como predictores sean del mismo grupo heterótico que aquellos cuyo comportamiento se intenta predecir.

Estos autores, comparando la precisión de las estimaciones de los BLUP con la máquina vectorial de regresión (SRV), concluyeron, con respecto al rendimiento, que éste es el carácter menos aconsejable para la construcción de un modelo de predicción. Esto se basa en que en el rendimiento a menudo la interacción genotipo×ambiente excede la contribución genética de los genotipos con respecto a la varianza total. Si un carácter está sujeto a una gran interacción genotipo×ambiente, se puede esperar que los efectos genotípicos, estimados sobre un gran número de ambientes, muestren una desviación de una estimación obtenida en un ambiente en particular, lo que puede suceder con los datos de validación cruzada obtenidos en los modelos de predicción. Dado que el mayor coeficiente de correlación, 0,51, se obtuvo al utilizar los datos de rendimiento de los híbridos predictores en base al promedio de los dos ambientes de mayor rendimiento y que los híbridos a predecir también fueron evaluados en un ambiente de altos rendimientos promedio, media para rendimiento 78 q/ha, esto indicaría la necesidad de evaluar los híbridos predictores en ambientes no limitantes tendiente a evitar

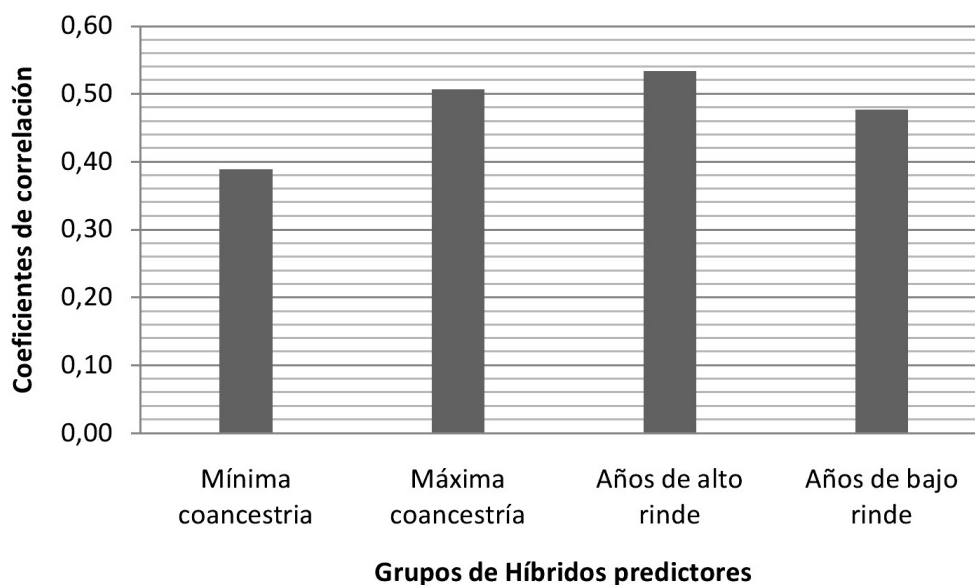
la influencia de la interacción genotipo  $\times$  ambiente como lo manifestaran Maenhout *et al.* (2010), maximizando, de esta forma, la precisión de las predicciones basadas en los BLUPs. Lo anterior sería indicado cuando el carácter a predecir es el rendimiento, que por lógica, es el carácter final en el cual está centrado el interés del mejorador para descartar aquellos genotipos de menor expresión y sólo llevar a evaluación a campo a los superiores.

Scharg *et al.* (2010) demostraron que de acuerdo a la magnitud de las relaciones entre el material de cría, la utilización de la información basada en el pedigrí y en el comportamiento *per se* dieron por resultado la más alta eficiencia en la predicciones. Agrega también que, para un híbrido no evaluado, los datos fenotípicos de sus líneas parentales o de los híbridos que posean una línea parental en común, pueden ser empleados como estimadores de los efectos totales de los genes relevantes involucrados en la determinación del carácter, por ejemplo del rendimiento en grano. Solamente en el caso de que no existan híbridos con padres en común y tampoco información relativa a los padres, la información molecular es indispensable para identificar los mejores híbridos potenciales.

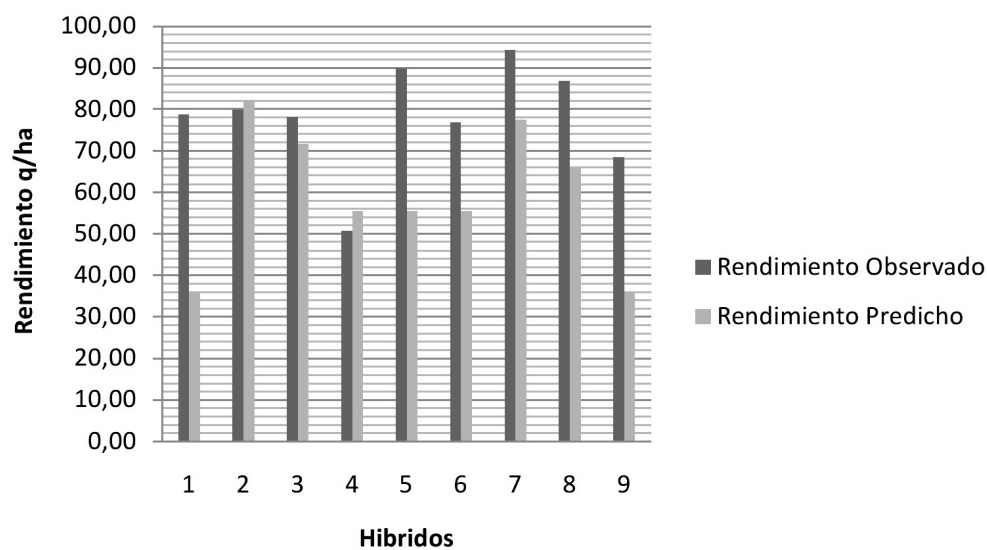
Se ha postulado que para que los estimadores BLUP sean efectivos es necesario disponer de un número de híbridos no inferior a 100, y cuanto mayor sea la cifra mejor será la precisión de las predicciones (Bernardo, 1996b).

A pesar del bajo número de genotipos empleado en este estudio, la correlación entre los híbridos predictores y aquellos a predecir fue de 0,51, valor que está dentro del rango hallado por los autores mencionados (0,45 a 0,75) teniendo en cuenta la evaluación en ambientes de mayores rendimientos.

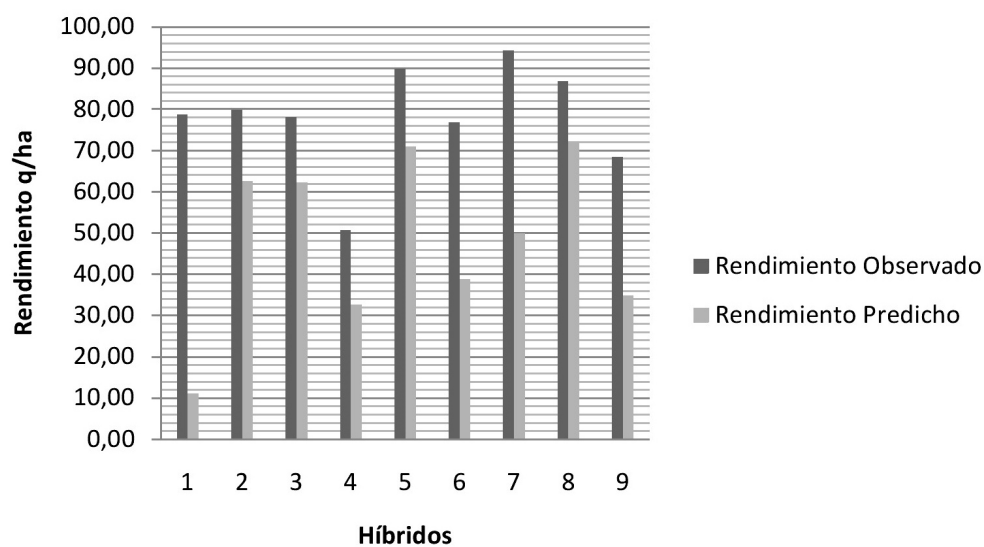
Las correlaciones entre híbridos predictores y aquellos a predecir halladas en este trabajo indican que la técnica de BLUP puede utilizarse en programas de mejoramiento que no cuenten con gran cantidad de genotipos evaluados, por ejemplo menor a 100 genotipos. El empleo de datos de rendimiento obtenidos en los ambientes de mayor rendimiento conjuntamente con la utilización de aquellos genotipos que maximicen las relaciones de parentesco permitió la mejor eficiencia en las predicciones de los híbridos no evaluados. Aun cuando las diferencias entre la eficiencia de las predicciones en base al empleo de ambientes de alto y bajo rendimiento fueron pequeñas en términos del coeficiente de correlación (0,53 *vs.* 0,48), es necesario remarcar que las diferencias cuantitativas para rendimiento entre los ambientes no fueron considerables (88,84 q/ha *vs.* 66,44 q/ha). Sin embargo, en el caso de emplear datos predictores a partir de ambientes con mayores diferencias se puede justificar plenamente el uso de datos provenientes de ambientes de máximo potencial de rendimiento.



**Figura 1.** Coeficientes de correlación entre valores observados y predichos de rendimiento en grano para híbridos de maíz en base a diferentes grupos de híbridos predictores.



**Figura 2.** Rendimiento observado y predicho para nueve híbridos en base a menor relación de parentesco entre híbridos predictores y evaluados.



**Figura 3.** Rendimiento observado y predicho para nueve híbridos en base a la mayor relación de parentesco entre híbridos predictores y evaluados.



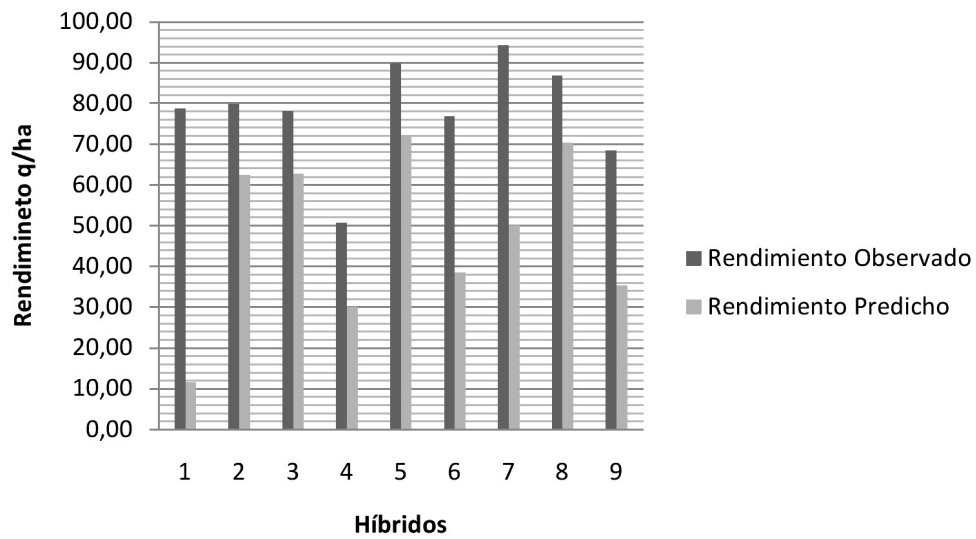


Figura 4. Rendimiento observado y predicho para nueve híbridos en base a los dos años de mayor rendimiento.

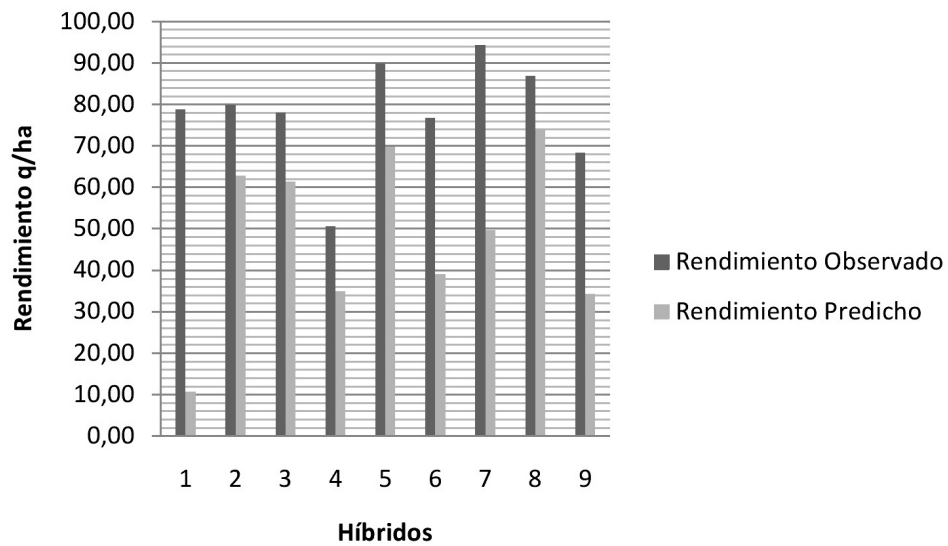


Figura 5. Rendimiento observado y predicho para nueve híbridos en base a los dos años de menor rendimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bernardo R. (1994) Prediction of maize single cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.* 34: 20-25.
- Bernardo R. (1995) Genetic models for predicting maize single-cross performance in unbalanced yield trial data. *Crop Sci.* 35: 141-147.
- Bernardo R. (1996a) Best linear unbiased prediction of maize single cross performance. *Crop Sci.* 36: 50-56.
- Bernardo R. (1996b) Best linear unbiased prediction of the performance of crosses between untested maize inbreds. *Crop Sci.* 36: 872-876.
- Dekalb (2010) Boletín Técnico N° 14. Maíz Tardío y de Segunda. Edición N° 1. [www.dekalb.com.ar](http://www.dekalb.com.ar).
- Falconer D.S. (1981) *Introducción a la Genética Cuantitativa*. 2nd Ed. Longman Inc. New York., 430 pp.
- Hallauer A.R. (1990) Methods used in developing maize inbreds. *Maydica* 35: 1-16.
- Henderson C.R. (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31: 423-447.
- Henderson C.R. (1984) *Applications of Linear Models in Animal Breeding*. University of Guelph, Ontario, Canada.
- INTA (1980) *El cultivo del Maíz*. Colección: Principales Cultivos de la Argentina. Buenos Aires, INTA, pp. 163.
- Maenhout S., De Baets B., Haesaert G., Van Bockstaele E. (2008) Marker-based screening of maize inbred lines using support vector machine regression. *Euphytica* 161: 123-131.
- Maenhout S., De Baets B., Haesaert G. (2010) Prediction of maize single-cross hybrid performance: support vector machine regression versus best linear prediction. *Theor. Appl. Genet.* 120: 415-427.
- Piepho H.P., Mohring J., Melchinger A.E., Büchse A. (2008) BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica* 161: 209-228.
- SAS Institute (2004) *Proc Inbreed. SAS User's Guide*. SAS Inst. Cary, NC.
- Schrag T.A., Maurer H.P., Melchinger A.E., Piepho H.P., Peleman J., Frisch M. (2007) Prediction of single-cross hybrid performance in maize using haplotype blocks associated with QTL for grain yield. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1345-1355.
- Schrag T.A., Möhring J., Melchinger A.E., Kusterer B., Dhillon B.S., Piepho H.P., Frisch M. (2010) Prediction of hybrid performance in maize using molecular markers and joint analyses of hybrids and parental inbreds. *Theor. Appl. Genet.* 120: 451-461.
- Seitz G. (2005) The use of doubled haploids in corn breeding. En: *Proceedings of the 41st annual Illinois corn Breeders' School 2005*, Urbana-Champaign: 1-7.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Resoluciones 162/12 y 124/13).

## CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GERMOPLASMA DE *MELILOTUS ALBUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR Y SSR

### CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY IN *MELILOTUS ALBUS* GERMPLASM BY ISSR AND SSR MOLECULAR MARKERS

Tomas P.A.<sup>1</sup>, Rivero M.N.<sup>2</sup>, Tomás M.A.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Litoral (UNL). Kreder 2805, Esperanza, Santa Fe.

<sup>2</sup> Becario estudiantil Científica INTA-UNL.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela. Ruta 34 km 227, Rafaela.

\* corresponding author: tomas.maria@inta.gob.ar

---

#### ABSTRACT

*Melilotus albus* is a legume plant naturalized in Argentina with a great potential to be used as a forage resource in restricted environments. Our objective was to characterize 10 accessions of *M. albus* belonging to a collection from INTA and from the FCA-UNL by using molecular markers. Five ISSR primers producing 52 bands, 90% of them polymorphic, were found to be equally informative. Eight SSR loci were amplified generating 30 alleles, averaging 3.8 alleles per locus, almost all of them highly informative. In numerical analysis, separation among accessions was unclear; genotypes congregate in complex intermixed groups. The greatest proportion of the variation was registered within accessions, in accordance with the allogamous reproductive nature of the species. Since neutral markers were used, the high variability encountered within accessions could be related to gene flow among them and/or a similar origin of the introduced materials. Results from this study support the fact that ISSR and SSR markers provide complementary information and that they are valuable and effective tools to be used to characterize the available germplasm of the species, although other markers such as the functional ones are recommended to better understand the variability in the species and its use in breeding programs.

**Key words:** *Melilotus*, genetic diversity, microsatellite, forage

#### RESUMEN

*Melilotus albus* es una leguminosa naturalizada en Argentina con gran potencial como recurso forrajero para ser utilizado en ambientes marginales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar 10 introducciones de la colección de INTA y de la FCA-UNL mediante marcadores moleculares. Cinco *primers* ISSR produjeron 52 bandas, 90% de ellas fueron polimórficas, resultando todos los *primers* igualmente informativos. Los 8 *loci* SSR amplificados generaron 30 alelos, con un promedio de 3,8 alelos por *locus*, siendo altamente informativos la gran mayoría de ellos. En los análisis mediante técnicas numéricas la separación entre grupos no fue clara; los genotipos se congregan en grupos entremezclados. La mayor proporción de la variación se observó dentro de las introducciones, correspondiendo con el modo de reproducción alógama de la especie. Por tratarse de marcadores moleculares neutrales, la elevada variabilidad común entre introducciones podría explicarse por la existencia de considerable flujo génico entre ellas y/o por un origen similar de los materiales introducidos. Los resultados de este estudio demostraron que los marcadores moleculares ISSR y SSR brindan información complementaria y son herramientas valiosas y eficaces para caracterizar el germoplasma disponible de esta especie, pero se precisa incluir a otros marcadores como los funcionales con el fin de tener una mejor comprensión de la variabilidad disponible y su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** *Melilotus*, diversidad genética, microsatélite, forraje

---

Fecha de recepción: 6/09/2016  
Fecha de aceptación de versión final: 10/05/2017

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en Argentina se ha visto progresivamente desplazada en las últimas décadas hacia zonas marginales de menor aptitud como ocasión de la expansión de cultivos extensivos y los efectos del cambio climático (Stritzler *et al.*, 2007; Easdale y Aguiar, 2012). Las especies que constituyen la base del sistema forrajero tradicional están en general poco adaptadas a las áreas marginales, lo que genera la necesidad de utilizar especies más tolerantes a estreses bióticos y abióticos como salinidad, sequía, etc. Entre los materiales promisorios se destaca *Melilotus albus* Medik., una especie alógama perteneciente a la familia de las leguminosas con formas anuales o bienales, originaria de Eurasia y naturalizada en Argentina (Clarke, 1935; Turkington *et al.*, 1978). Entre sus ventajas se citan alta producción de biomasa forrajera y semillas, tolerancia a temperaturas extremas, rusticidad, calidad y altas tasas de fijación de nitrógeno, características por las cuales la forma anual es valorada como recurso forrajero en diversos tipos de suelo y clima (Bruno *et al.*, 1982; Maddaloni, 1986; Evans y Kearney, 2003; Evans *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2008; López *et al.*, 2016). Actualmente esta especie está incluida en diversos programas de mejoramiento genético, pero son escasas las referencias respecto a la diversidad genética representada en colecciones de germoplasma en Argentina.

La caracterización genotípica de las colecciones de germoplasma es de gran utilidad para iniciar programas de mejoramiento eficientes basados en la recombinación de variabilidad. Los marcadores moleculares de ADN son ampliamente utilizados para el análisis de diversidad genética en colecciones vegetales (Powell *et al.*, 1996; Rallo *et al.*, 2000; Bolaric *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012). En particular para *M. albus*, estudios previos han utilizado con éxito las técnicas de marcadores ISSR (*inter simple sequence repeats*) y SSR (*simple sequence repeats*) en germoplasma de diverso origen (Winton *et al.*, 2007; Aboel-Atta, 2009; Wu *et al.*, 2016).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad genética de una colección de germoplasma de *M. albus* de Argentina, con el fin de generar información de utilidad para programas de conservación y manejo productivo de la variabilidad disponible en la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se analizaron 10 introducciones de *Melilotus albus* (Tabla 1), nueve de ellas pertenecientes a una colección de trabajo del INTA, a partir de la cual se inició un programa de mejoramiento en la especie, que fuera oportunamente facilitada por el Ing. Agr. José Pedro de Battista (INTA – EEA Concepción del Uruguay). Esta colección abarca tanto introducciones cuya selección y multiplicación ha sido realizada de manera controlada (materiales comerciales y de semilla identificada), como así también colectas de poblaciones naturalizadas luego de más de tres décadas de polinización libre y resiembra natural en el ambiente local, denominadas ecotipos. La restante introducción aquí analizada corresponde a un material pre-comercial que integra el Banco de Germoplasma de la Facultad de Cs. Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, cedido por el Dr. Juan M. Zabala (ProDoCoVa, UNL).

Se germinaron muestras de semillas de las diferentes introducciones en placas de Petri, sobre papel de filtro humedecido con agua destilada y se incubaron en estufa a 30 °C durante dos semanas. Las plántulas se colocaron en macetas hasta el momento de la extracción de ADN. Cada introducción estuvo representada por 10 genotipos.

### *Extracción de ADN*

El ADN total fue extraído a partir de 300-500 mg de hojas jóvenes frescas según Doyle y Doyle (1990). La calidad y concentración de cada muestra fue verificada por espectrofotometría (Nanodrop, Rad® SmartSpec Plus) y se estandarizó la concentración de ADN final en 250 ng/μL previo a su almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

### *Marcadores ISSR*

A partir de una evaluación previa de 38 *primers* ISSR en 10 genotipos, en función de los patrones de bandas generados y su repetibilidad, se seleccionaron los siguientes cinco *primers* para el análisis completo: UBC809 [(AG)<sub>8</sub>G]; UBC815 [(CT)<sub>8</sub>G]; UBC836 [(AG)<sub>8</sub>YA]; UBC841 [(GA)<sub>8</sub>YC] y UBC848 [(CA)<sub>8</sub>RG]. Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un termociclador Techne TC-312 para un volumen final de 20 μL con las siguientes concentraciones: 50 ng de ADN genómico, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,

**Tabla 1.** Identificación, tipo y origen de las introducciones de *Melilotus albus* analizadas.

Introducción	Id.	Tipo y procedencia del material*	Banco de Germoplasma
Baralbo	BA	Comercial - Barenbrug-Palaversich	INTA
Guasch	GU	Comercial – Guasch semillas	INTA
Lazzeró	LA	Semilla identificada – Procedencia campo de productor	INTA
Laguna Larga	LL	Ecotipo – Población colectada en centro de Córdoba	INTA
Logroño	LO	Ecotipo – Población colectada en noroeste de Santa Fe	INTA
La Sarita	LS	Ecotipo – Población colectada en noreste de Santa Fe	INTA
Peuser	PE	Semilla identificada – Procedencia campo de productor	INTA
Sampacho	SA	Ecotipo – Población colectada en sur de Córdoba	INTA
Santiago del Estero	SE	Ecotipo – Población colectada en centro de Sgo. del Estero	INTA
Esperanza	ES	Material precomercial – UNL – O. Peman & Asoc.	FCA-UNL

\* Origen de las introducciones conservadas en INTA según López et al. (2016).

0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de *primer* y 1U Taq ADN polimerasa (Embiotec, Arg.), en 1X *buffer* de PCR provisto con la polimerasa. El programa de amplificación consistió de 1,5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a la *Tm* del respectivo *primer* y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación generados fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,2% en *buffer* 1X TAE, durante tres horas a 75 V constantes. En cada ensayo se incluyó un estándar de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Fermentas). Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante tinción fluorescente (GelRed, Genbiotech) en transiluminador UV y registrados mediante fotografía digital para su posterior análisis.

#### *Marcadores SSR*

Se analizaron ocho *loci* SSR descritos por Winton *et al.* (2007) para la especie: MaMS03, MaMS04, MaMS06, MaMS08, MaMS10, MaMS12, MaMS13 y MaMS15. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador antes mencionado, en un volumen final de 20 µL y con las siguientes concentraciones: 12,5 ng de ADN genómico, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* y 1U de GoTaq DNA polimerasa (PROMEGA) en 1X *buffer* de PCR provisto con la polimerasa. El programa de amplificación consistió de una primera etapa de 11 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 55 °C (decreciendo 0,5 °C por ciclo) y 35 s a 68 °C; seguida de una segunda etapa de 26 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 35 s a 68 °C,

con una extensión final de 15 min a 60 °C. La separación de los fragmentos generados se realizó mediante electroforesis vertical en geles nativos de poli(acrilamida) al 6 % (19:1 acrilamida: bis-acrilamida) en *buffer* 1X TBE a 45 W constantes. Los patrones de bandas fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata (Benbouza *et al.*, 2006) y registrados en transiluminador de luz blanca.

#### *Análisis de datos*

Los fragmentos ISSR se registraron en una matriz binaria como presencia (1) y ausencia (0), mientras que para los marcadores SSR se registraron los alelos presentes correspondientes a cada *locus*, tomando una columna por *locus* y un carácter por alelo. Se estimó para cada ensayo la proporción de bandas polimórficas, el contenido de información polimórfica (PIC) (Powell *et al.*, 1996) y el número de bandas exclusivas de poblaciones. Para cada *primer* ISSR se determinó también el porcentaje de bandas con frecuencia contrastante (BFC) entre introducciones (bandas cuya frecuencia presentó una diferencia mayor a 0,5 entre al menos dos introducciones), mientras que para SSR se determinó además el número de alelos totales y efectivos para cada *locus*. La comparación entre poblaciones se realizó mediante los parámetros de diversidad genética y heterocigosidad insesgada de Nei (He) basada en los marcadores SSR (Nei, 1972), siendo los valores comparados estadísticamente mediante la prueba de Friedman.

La proporción de la variación dentro y entre las introducciones se determinó por análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992; Peakall *et al.*, 1995). Dado que las dos técnicas de marcadores moleculares empleadas podrían presentar diferencias al estimar la similitud, las matrices de distancia obtenidas a partir de cada tipo marcador fueron sometidas a un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para determinar, a partir de los gráficos de dispersión, posibles configuraciones de la variabilidad en cada grupo de datos. Además, se halló una configuración común de consenso entre ambos tipos de marcadores para armonizar las configuraciones individuales a través de un Análisis de Procrustes Generalizado (Gower, 1975).

El análisis de agrupamiento se llevó a cabo combinando la información generada por ambos tipos de marcadores moleculares. Para ello se confeccionó una nueva matriz de datos, donde para cada genotipo se registraron a los *locus* ISSR en como presencia (1) y ausencia (0), mientras que cada alelo SSR se registró como homocigota (2), he-

terocigota (1) o ausente (0). De este modo, se minimizaron las diferencias entre genotipos debidas a falsos negativos en el cálculo de la distancia genética a partir de la matriz original, la cual es sensible al orden de los dígitos que representan a cada alelo. Se utilizó el coeficiente de Jaccard, estimando la distancia como  $D = \sqrt{1-S}$ , y se construyeron los respectivos dendrogramas mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). Todos los parámetros se calcularon utilizando el *software* estadístico INFOGEN v2013p (Balzarini y Di Rienzo, 2013).

## RESULTADOS

Los cinco *primers* ISSR utilizados generaron en total 52 fragmentos, 90% de los cuales resultaron polimórficos. La proporción de bandas polimórficas y valor de PIC fueron similares entre *primers* (Tabla 2). Aunque no se registraron bandas exclusivas de introducciones, todos los *primers* presentaron un porcentaje de BFC superior al 50%.

Los ocho SSR analizados generaron productos de amplificación en todos los genotipos de las 10 introducciones. El número de alelos por *locus* ( $N_A$ ) varió entre dos y siete, mientras que el número de alelos efectivos ( $A_e$ ) presentó un rango de 1,1 a 4,8. Los valores de PIC fueron similares entre *locus* SSR, con la excepción de MaMS03, el cual presentó menores niveles de polimorfismo y resultó el *locus* menos informativo (Tabla 3). Para las introducciones GU y LA se registró un alelo privado para los *loci* MaMS13 y MaMS15 respectivamente, estando los mismos en baja frecuencia, ya que fueron registrados para un único genotipo de la correspondiente introducción.

Todas las introducciones analizadas registraron similares proporciones de *loci* polimórficos en ambos sistemas de marcadores, sin presentar diferencias estadísticas significativas entre las mismas para los valores de heterocigosidad insesgada de Nei y diversidad genética (Tabla 4).

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se observó que la mayor proporción de la variabilidad se encontró dentro de las introducciones, tanto para cada tipo de marcador como para el conjunto de datos moleculares (Tabla 5).

En el ACoP basado en los marcadores ISSR, los dos primeros ejes explican el 51,7 % de la variabilidad total (Figura 1a). Los genotipos de SE, PE y cuatro de GU se agruparon en el cuadrante inferior derecho. El resto de los genotipos se presentó en una nube de puntos continua,

donde los genotipos de LO, BA y SA se ubicaron en los cuadrantes de la izquierda y los de ES y LS al centro del gráfico. Para el ACoP basado en los marcadores SSR, los dos primeros ejes explican el 42,82% de la variación (Figura 1b). Los genotipos mostraron una distribución más laxa que la obtenida con los ISSR y no fue posible diferenciar ningún nivel de agrupamiento relacionado a las introducciones. No obstante, en el Análisis de Procrustes Generalizado se encontró un 64,8% de consenso entre ambos tipos de marcadores. Esta configuración tampoco conglomeró a los genotipos de acuerdo a su origen en grupos definidos (datos no presentados), pero por el nivel de consenso se

considera a ambos tipos de marcadores como informativamente complementarios.

En el análisis de agrupamiento, los genotipos no se agruparon por introducción en el dendrograma (Figura 2), mientras que las distancias entre genotipos de cada introducción concuerdan con los resultados del AMOVA. Los cuatro grandes grupos indicados en la representación gráfica no evidenciaron una diferenciación significativa entre sí en base al contraste entre la distancia genética inter e intra-grupo, y parecen estar conformados por múltiples introducciones y de procedencias geográficas muy distantes.

**Tabla 2.** Características de los *primers* ISSR utilizados e información generada con cada uno de ellos para *Melilotus albus*: proporción de bandas polimórficas, de bandas con frecuencia contrastante entre introducciones (BFC) y contenido de información polimórfica (PIC).

<i>Primer</i> ISSR	Secuencia 5' - 3'	Tm (°C)	Bandas totales	Bandas polimórficas (%)	BFC (%)	PIC
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	42	11	100	64	0,25
UBC815	(CT) <sub>8</sub> G	40	10	90	70	0,3
UBC836	(AG) <sub>8</sub> YA	44	10	80	60	0,26
UBC841	(GA) <sub>8</sub> YC	43	9	100	89	0,3
UBC848	(CA) <sub>8</sub> RG	59	12	83,3	83	0,3
Promedio		-	10,4	90,6	73	0,28

**Tabla 3.** Características de los SSR analizados e información generada: número de alelos por *locus* (N<sub>A</sub>); número de alelos efectivos (Ae); heterocigosidad insesgada de Nei (He) y valor de PIC para las introducciones de *Melilotus albus*.

<i>Locus</i> SSR*	Secuencia de <i>primers</i> 5' - 3'*	N <sub>A</sub>	Ae	He	PIC
MaMS03	F: TCGTGTTTGTTCATGTTTGTT R: ATACTCCCATGAGACTGTGG	2	1,06	0,06	0,05
MaMS04	F: AGAAGAAATCGTCGCTGATA R: CTCCAGATCATAACCGTCAAT	4	2,02	0,51	0,4
MaMS06	F: CTAGACCAAATGCTCCTCGAC R: TTAATAGACCCGGATTCAAA	3	1,81	0,45	0,36
MaMS08	F: GATTAAGATTGCACGGATGT R:CGTTTAAGTCATCAGCATCA	3	1,56	0,36	0,58
MaMS10	F: TCTATGCTCCTCTCATTCGT R: CCACTTCCTCACTTCATCAT	4	2,8	0,65	0,28
MaMS12	F: AGTAGGATGTGGCATTGAAG R: CAAATTTGCAGTCACTTTGA	4	2,81	0,65	0,58
MaMS13	F: CCACCTTGAATAATCACCAT R: GCGCTATAACGTAGCAGAAT	3	2,01	0,51	0,39
MaMS15	F: CAACACCACTCTTCACTCAA R: AATGCGTTTCTACAGTCGTT	7	4,78	0,79	0,76
	Promedio	3,8	2,35	0,5	0,22

\* *Locus* SSR y secuencia de *primers* según Winton *et al.* (2007).

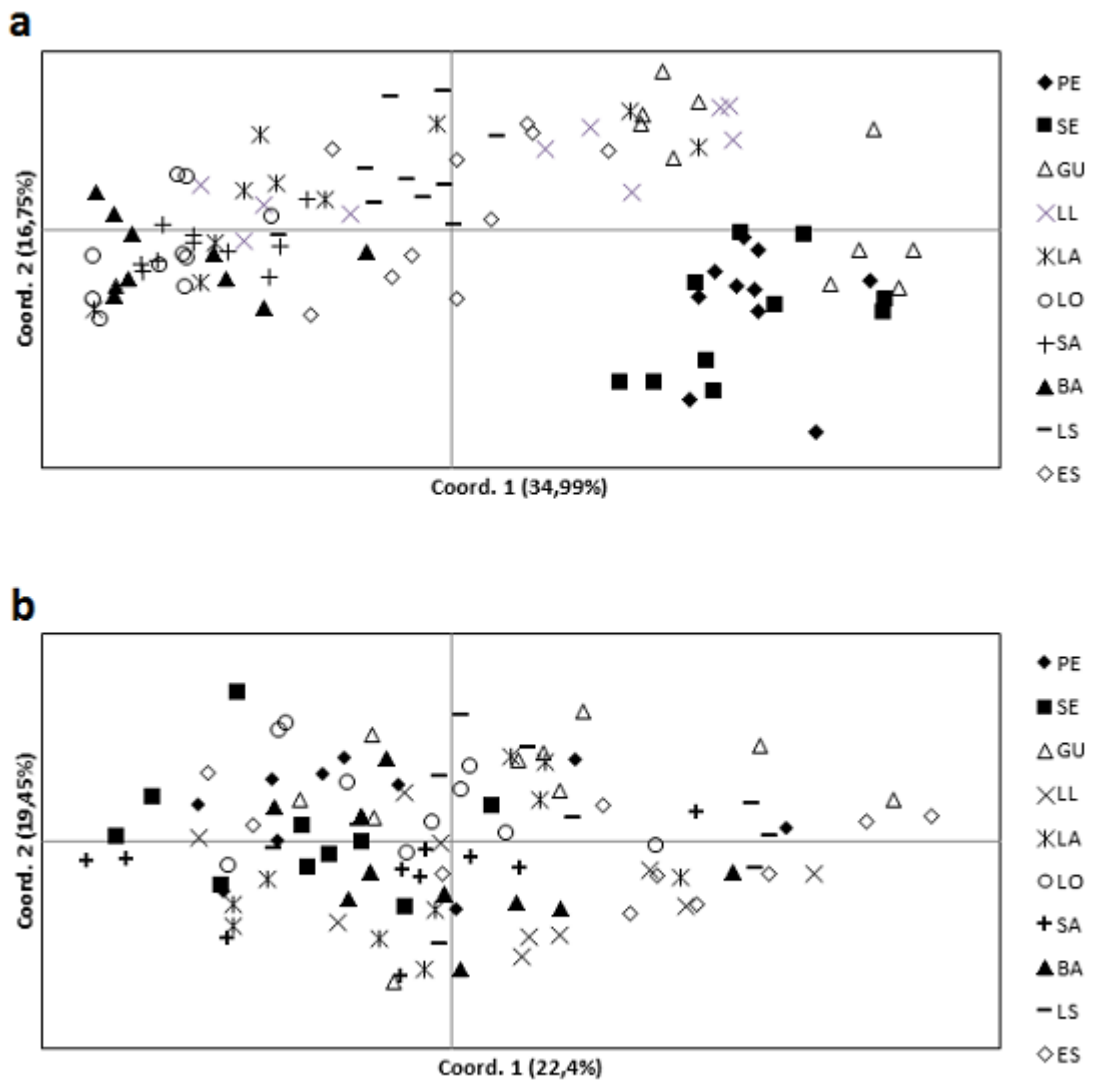


**Tabla 4.** Análisis comparativo entre introducciones de *Melilotus albus* para proporción de polimorfismos en cada tipo de marcadores moleculares, y los valores de heterocigosidad incesgada de Nei (He) y diversidad genética basados en los marcadores SSR.

Introducción	Loci polimórficos (%)		He	Diversidad genética
	ISSR	SSR		
LL	76,1	88	0,39	0,37
SE	69	75	0,39	0,37
LA	77,1	88	0,48	0,45
GU	78,9	88	0,50	0,47
SA	66,7	100	0,43	0,41
PE	76,2	100	0,50	0,48
BA	73,8	100	0,47	0,45
LO	68,2	100	0,54	0,51
LS	73,8	88	0,44	0,42
ES	73,2	100	0,48	0,46
Promedio	73,3	93	0,46	0,44

**Tabla 5.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre y dentro de las introducciones de *Melilotus albus* analizadas para cada tipo de marcadores y para ambos marcadores.

Fuente de variación	Variabilidad (%)		
	ISSR	SSR	Combinación
Dentro de introducciones	77,6	91,2	80,9
Entre introducciones	22,4	8,8	19,1
Phi -ST			0,19



**Figura 1.** Análisis de Coordenadas Principales para cada tipo de marcadores moleculares empleados en el análisis de las introducciones de *Melilotus albus*. a) Análisis basado en datos de ISSR; b) Análisis basado en datos de SSR.

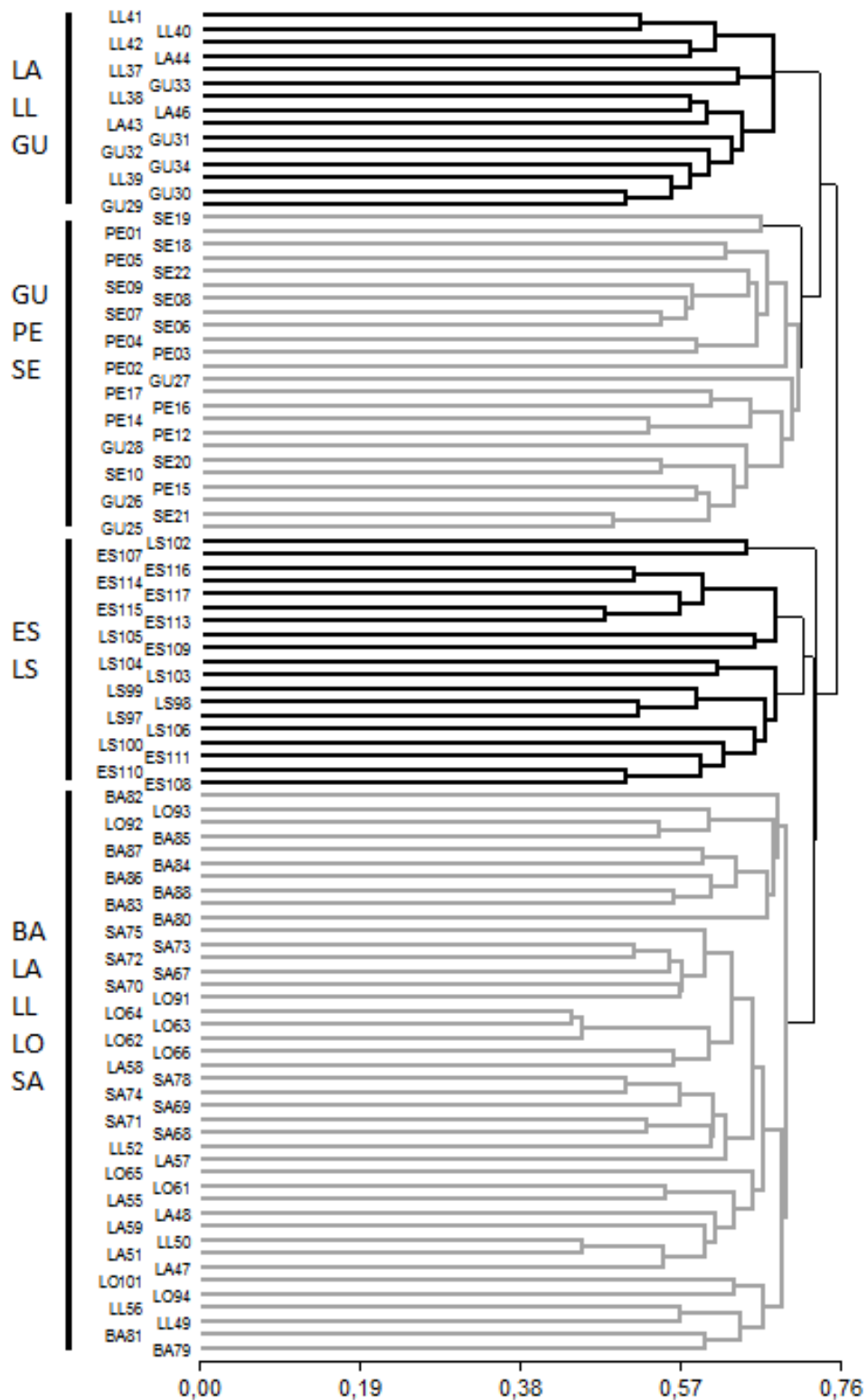


Figura 2. Análisis de agrupamiento de las introducciones de *Melilotus albus* basado en las distancias genéticas estimadas utilizando marcadores moleculares ISSR y SSR combinados. A la izquierda se indica mediante acrónimo, la introducción a la que pertenecen los genotipos de esa sección del dendrograma.

## DISCUSIÓN

El empleo de marcadores moleculares ISSR y SSR resultó eficaz para la caracterización de la colección de germoplasma de *Melilotus albus* analizada. Ambos tipos de marcadores moleculares presentaron elevados niveles de polimorfismo y considerable cantidad de fragmentos generados por ensayo, lo que permitió el análisis genotípico del material bajo estudio.

Las proporciones de polimorfismos detectadas mediante ISSR en este trabajo fueron superiores a las reportadas en otro estudio en especies del mismo género (Aboel-Atta, 2009), aunque este tipo de diferencias suelen ser relativas a la diversidad genética propia de los materiales analizados en cada caso y a la elección de los *primers*. Por ello, al tratarse de una colección local sin datos de referencia acerca de la variabilidad existente, la prueba preliminar y posterior selección de los *primers* a utilizar en la totalidad del ensayo constituye un paso clave para obtener altos niveles de polimorfismo. Los *primers* utilizados resultaron igualmente informativos para la caracterización en función de sus valores de PIC, si se tiene en cuenta que el valor máximo de dicho parámetro para un marcador ISSR es de 0,5 (Henry, 1997). Sin embargo, para estudios de la diversidad genética en *M. albus* basados únicamente en esta técnica sería recomendable ampliar el número de genotipos por introducción y la cantidad de *primers* a utilizar por tratarse de una especie alógama y de marcadores de tipo dominante. Esto permitiría estimar mejor las frecuencias alélicas de los materiales y un mejor contraste entre los mismos.

La mayoría de los *loci* SSR analizados presentaron, en general, una cantidad de alelos totales y promedio por *locus* similares a los reportados por Winton *et al.* (2007) en esta especie. Las diferencias observadas respecto del número de alelos para algunos *loci* son atribuibles al diferente origen de los materiales analizados en cada caso. La capacidad potencial para la identificación de variaciones genéticas relacionadas con el origen del germoplasma analizado, resalta la utilidad de este tipo de marcadores para comparar la diversidad existente en diferentes colecciones vegetales (Powell *et al.*, 1996; Varshney *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). Si bien el valor PIC promedio para los SSR analizados puede considerarse bajo comparados con otros estudios (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014), el 50 % de los *loci* microsatélite presentaron valores elevados de PIC. Estas diferencias entre los SSR utilizados permitiría seleccionar aquellos que resulten más informativos para futuros análisis del germoplasma.

Aunque se trata de una especie introducida y que los materiales analizados podrían haber sufrido procesos previos de selección y/o de deriva genética (López *et al.*, 2016), en el análisis de la diversidad genética todas las introducciones presentaron importantes niveles de polimorfismos y de heterocigosidad, principalmente dentro de las mismas. Estos resultados sugieren que esta colección constituye un recurso a conservar y evaluar como potencial fuente de variabilidad para programas de mejoramiento genético de la especie, principalmente, por tratarse en muchos casos de introducciones obtenidas a partir de ecotipos localmente adaptados.

Tanto en el análisis de agrupamiento como en el AMOVA, se evidenció que la mayor proporción de la variabilidad se presentó dentro de las introducciones. Aunque la mayoría de las bandas polimórficas registraron frecuencias contrastantes entre introducciones, dicho contraste no permitió agrupar a los materiales según su similitud genética, debido a que dichas diferencias de frecuencia no involucran las mismas introducciones en todos los casos, imposibilitando así establecer un patrón de diferenciación entre materiales. Además, son solamente dos las introducciones con alelos privados, los cuales se presentaron en un único genotipo, contribuyendo de manera escasa a la diferenciación entre materiales. En consecuencia, aunque algunos genotipos eventualmente se asocian en el dendrograma según la introducción de la cual provienen, lo hacen a una distancia mayor a la mitad de la distancia total estimada, por lo que no fue posible definir precisamente las introducciones. Sin embargo, dado que no hay un registro certero de los eventos de introducción en la Argentina, y que algunas de las poblaciones colectadas parecen estar naturalizadas en el lugar y se desconoce su material de origen, no es posible descartar que la variabilidad obtenida esté ligada al origen de los genotipos. Por ello, es posible que la asociación de grupos visualizada en la Figura 2 exprese la relación de los ecotipos con materiales comerciales antiguos que tengan un origen común con los materiales comerciales actuales. De esta forma, no es posible descartar, por ejemplo, que los genotipos de *Melilotus albus* del ecotipo LL, así como los genotipos de semilla identificada LA pudieran derivar o estar relacionados con algún material anterior a las semillas del proveedor comercial GU. En estudios que caracterizan la variabilidad de colecciones de plantas alógamas, la mayor proporción de variabilidad que se reporta dentro de las poblaciones es generalmente atribuida a la existencia de elevado flujo génico entre las mismas potenciado por su modo reproductivo, y en muchos casos una base genética

común (Lai *et al.*, 2001; Amel *et al.*, 2005; Bolaric *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012). Estas consideraciones tendrían relevancia similar para *M. albus* por tratarse de una especie naturalizada en Argentina. Aun cuando no se conocen los orígenes y tipos de materiales inicialmente introducidos a la región, ni el número de eventos de introducción, un elevado flujo génico producto de la polinización cruzada podría haber reducido cualquier diferenciación entre los materiales originalmente introducidos, resultando en poblaciones con un acervo genético compartido, con escasa diferenciación entre ellas, pero con amplia variación genética intra-poblacional (Hamrick y Godt, 1989).

Nuestros resultados muestran que las introducciones procedentes de poblaciones naturalizadas presentan similares niveles de variabilidad genética respecto de aquellas introducciones que han sufrido un proceso de selección genética por tratarse de materiales mejorados (ES, GU y BA), en los cuales se esperaría observar menor diversidad genética. Además, las introducciones de poblaciones naturalizadas tampoco se diferencian significativamente entre sí, aun proviniendo de ambientes distantes que podrían haberlas sometido a presiones selectivas diferentes, las que ocasionarían cambios en su estructura genética. Resulta evidente entonces que los marcadores neutrales empleados en este estudio reflejan en mayor medida el acervo genético común de las introducciones analizadas, más allá de las variaciones producto de los procesos de adaptación y selección a los cuales cada material ha sido sometido.

En conclusión, dentro de la colección analizada de *M. albus* la diversidad genética se encuentra en mayor medida dentro de las introducciones, las cuales no pudieron ser diferenciadas genéticamente mediante los marcadores moleculares utilizados. Por otra parte, dada la escasa diferenciación entre las diversas procedencias analizadas, se estima que todo el material disponible en la colección comparte un mismo origen y se dificulta su identificación mediante marcadores moleculares de tipo neutral. No obstante, no se descarta la posibilidad de que puedan ser diferenciados por otro tipo de marcadores, como ser caracteres morfológicos, productivos o fisiológicos. Finalmente, se considera que para lograr incrementos significativos de la diversidad de la colección o para ampliar la variabilidad en programas de mejora que utilicen estas introducciones sería necesario recurrir a cruzamientos con materiales de la especie externos a la colección y con un acervo genético diferente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Atta A.I. (2009) Isozymes, RAPD and ISSR variation in *Melilotus indica* (L.) All. And *M. siculus* (Turra) BG Jacks. (Leguminosae). Int. J. Plant Sci. 2: 113-118.
- Amel S.H., Khaled C., Messaoud M., Mohamed M., Mokhtar T. (2005) Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. Genet. Resour. Crop Evol. 52: 563-573.
- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2013) InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P., Margeai G. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77-81.
- Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K. (2005) Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. Plant Breed. 124: 161-166.
- Bruno O.A., Fossati J.L., Panigatti J., Gambudo S., Quaino O.R. (1982) Intersiembrado de trébol de olor de flor blanca sobre grama rhodes en los Bajos Submeridionales, Santa Fe. INTA, EEA Rafaela. Informe técnico N° 11, pp. 17.
- Clarke A.E. (1935) Inheritance of annual habit and mode of pollination in an annual white sweet clover. Jour. Amer. Soc. Agron. 27: 492-496.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Easdale M., Aguiar M. (2012) Regional forage production assessment in arid and semi-arid rangelands. A step towards social ecological analysis. J. Arid Environ. 83: 35-44.

- Evans P.M., Kearney G.A. (2003) *Melilotus albus* Medic is productive and regenerates well on saline soils neutral to alkaline reaction in the high rainfall zone of south-western Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 43: 349-355.
- Evans P.M., Trigg P.J., Kearney G.A., Byron A.H. (2005) Effect of cutting regime on the agronomic performance of two contrasting lines of *Melilotus albus*. *Animal Prod. Sci.* 44: 1177-1183.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Gower J.C. (1975) Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33-51.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 43-63.
- Henry R.J. (1997) Estimation of genetic variation in plants using molecular techniques. In: Henry R.J. (Ed.) *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman & Hall, London, pp. 57-98.
- Lai J.A., Yang W.C., Hsiao J.Y. (2001) An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Bot. Bull. Acad. Sc.* 42: 93-100.
- Liu Z.P., Liu G.S., Yang Q.C. (2007) A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology* 30: 385-391.
- López C., Odorizzi A., Basigalup D., Arolfo V., Martínez M.J. (2016) El trébol de olor blanco y su uso en la provincia de Córdoba. *Publicación Técnica, Colección Recursos*. EEA Manfredi, Ediciones INTA, Buenos Aires pp. 35.
- Maddaloni J. (1986) Forage production on saline ad alkaline soils in the humid región of Argentina. *Reclam. Reveg. Res.* 5: 11-16.
- Nei M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Peakall R., Smouse P.E., Huff D.R. (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalo grass *Buchloe dactyloides*. *Mol. Ecol.* 4: 135-147.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Rallo P., Dorado G., Martin A. (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. App. Genet.* 101: 984-989.
- Rogers M.E., Colmer T.D., Frost K., Henry D., Cornwall D., Hulm E., Deretic J., Hughes S.R., Craig A.D. (2008) Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *Pl. Soil* 304: 89-101.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973) *Numerical Taxonomy – The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman W.H. & Co., San Francisco, pp. 573.
- Stritzler N.P., Petrucci H.J., Frasinelli C.A., Veneciano J.H., Ferri C.M., Viglizzo E.F. (2007) Climatic variability in the Argentine central semiarid Region. *Technological adaptation in extensive systems of animal production*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 27:111-123.
- Turkington R.A., Cavers P.B., Rempel E. (1978) The biology of Canadian weeds. 29. *Melilotus alba* Dear and *M. officinalis* (L.) Lam. *Can. J. Pl. Sci.* 49: 1-20.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-55.

Wang Z., Yu G., Shi B., Wang X., Qiang H., Gao, H. (2014) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and in silico mapping onto the *M. truncatula* genome. PLoS One 9: e92029.

Winton L.M., Krohn A.L, Conn J.S. (2007) Microsatellite markers for the invasive plant species white sweetclover (*Melilotus alba*) and yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). Mol. Ecol. Notes 7: 1296-1298.

Wu F, Zhang D., Ma J., Luo K., Di H., Liu Z., Zhang J., Wang Y. (2016) Analysis of genetic diversity and population structure in accessions of the genus *Melilotus*. Ind. Crops Prod. 85: 84-92.

Xie W.G., Lu X.F, Zhang X.Q., Huang L.K., Cheng L. (2012) Genetic variation and comparison of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. Genet. Mol. Res. 11: 425-433.

Zhou Q., Chen T.L., Wang Y.R., Liu Z.P. (2014) The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. Biochem. Syst. Ecol. 57: 227-230.

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Ing. José Pedro de Battista por su guía en etapas iniciales del proyecto, al Ing. Juan Marcelo Zabala por el material procedente de FCA-UNL y a los revisores anónimos que enriquecieron el manuscrito con sus apreciaciones y sugerencias. Agradecemos el financiamiento del INTA (proyecto PNPA 1126072) y el CAI+D UNL 2011 N°501201101-00090LI.





# POLIMORFISMOS SEROTONINÉRGICOS: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN DE MAR DEL PLATA, ARGENTINA Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE GENOTIPADO

## SEROTONERGIC POLYMORPHISMS: ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCY DISTRIBUTION IN THE MAR DEL PLATA, ARGENTINA, POPULATION AND COMPARISON OF GENOTYPING METHODS

Perez Maturo J.<sup>1\*</sup>, Videla Y.<sup>1</sup>, Di Gerónimo V.<sup>2</sup>, Quintana S.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3350, 7600, Mar del Plata, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Análisis Fares Taie, Rivadavia 3331, 7600, Mar del Plata, Buenos Aires.

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina.

\* corresponding author: josefinap.m@hotmail.com

### ABSTRACT

There are variable responses to Serotonin Selective Reuptake Inhibitors (SSRIs) among patients treated with this medication. Polymorphisms found in the genes coding for the serotonin transporter (5-HTT) and the serotonin 2A receptor (5-HTR2A) can be used as genetic biomarkers capable of predicting treatment efficacy. The *SLC6A4* gene has two polymorphisms: 5-HTTLPR, consisting of an insertion/deletion of 44 bp, and 5-HTTVNTR, characterized by 9, 10 or 12 copies of a region of 16–17 bp. Gene *5-HTR2A* presents the 1438 G/A SNP. In order to obtain the allelic and genotypic frequencies of the listed polymorphisms in a sample of the Mar del Plata city population, Argentina; PCR and PCR-RFLP methodologies were applied to genotype the 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms and the 1438 G/A SNP in 384 unrelated individuals. Different primers for genotyping were compared. The allelic and genotypic frequencies obtained for polymorphism were the following: 5-HTTLPR polymorphism L/L: 18 %; L/S: 61 %; S/S: 21 % (Freq allelic L: 49 %; S: 51 %) and the 5-HTTVNTR 12/12: 42 %, 12/10: 41 %; 10/10: 17 % (Freq Allelic 10: 37.5 %; 12: 62.5 %). For polymorphism 1438 G/A GA: 47 % GG: 36 %, AA: 17 % (Freq allelic G: 59.5 %; A: 40.5 %). This study will provide useful data for investigations that require the use of these polymorphisms as genetic markers linked to the response to psychoactive drugs in our population.

**Key words:** serotonergic polymorphisms, population frequencies for depression, pharmacogenetics

### RESUMEN

La respuesta a los ISRS (Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina) entre los pacientes bajo tratamiento con esta medicación es variable. Los polimorfismos hallados en los genes que codifican para el transportador de serotonina (5-HTT) y para el receptor de serotonina 2A (5-HTR2A) pueden utilizarse como biomarcadores genéticos capaces de predecir la respuesta al fármaco. El gen *SLC6A4* presenta dos polimorfismos: 5-HTTLPR, que consiste en una inserción/delección de 44 pb, y 5-HTTVNTR caracterizado por 9, 10 o 12 copias de una región de 16–17 pb. El gen *5-HTR2A* presenta el marcador SNP 1438 G/A. Con el objetivo de calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos mencionados en una muestra de la población marplatense se pusieron a punto metodologías de PCR y PCR-RFLP que permitieron genotipificar los polimorfismos 5-HTTLPR, 5-HTTVNTR y el marcador SNP 1438 G/A en 384 individuos no relacionados de la población marplatense. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas fueron las siguientes: para el polimorfismo 5-HTTLPR L/L: 18 %; L/S: 61 %; S/S: 21 % (Frec. alélica L: 49 %; S: 51 %) y para el polimorfismo 5-HTTVNTR 12/12: 42 %, 12/10: 41 %; 10/10: 17 % (Frec. Alélica 10: 37,5 %; 12: 62,5 %). Para el polimorfismo SNP 1438 G/A GA: 47 %, GG: 36 %, AA: 17 % (Frec. alélica G: 59,5 %; A: 40,5 %). Este estudio aportará datos de utilidad para investigaciones que requieran el uso de estos polimorfismos como marcadores genéticos vinculados a la respuesta a psicofármacos en nuestra población.

**Palabras clave:** polimorfismos serotoninérgicos, frecuencias poblaciones para depresión, farmacogenética

## INTRODUCCIÓN

Los Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS) son actualmente los fármacos más utilizados para tratar estados depresivos y otras patologías psiquiátricas como ansiedad, desórdenes de personalidad, esquizofrenia, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), ya que generan menos efectos secundarios en relación a los antidepresivos tricíclicos y a los IMAO. Actúan bloqueando la recaptura o limpieza de la serotonina (5-HT) por parte del transportador de serotonina (5-HTT), lo que incrementa el nivel del neurotransmisor en la hendidura sináptica (Rakel, 2009; Artiga, 1997).

A pesar de que los ISRS son más tolerables y seguros que otros antidepresivos, existe una respuesta variable a la medicación entre los pacientes bajo tratamiento. Se han detectado casos de síndrome serotoninérgico, síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, arritmias cardíacas, hipotensión, convulsiones, depresión del SNC, empeoramiento de la depresión y efectos adversos a nivel gastrointestinal (Looper, 2007).

Si bien se han tratado de identificar predictores de respuesta farmacológica en base a variables fenotípicas, no se han logrado tener mediciones de estas variables que se correlacionen de forma constante con la respuesta al tratamiento. Los abordajes genéticos-moleculares proveen un método novedoso capaz de predecir la respuesta al fármaco. Esta nueva herramienta constituye la base de la farmacogenética o medicina personalizada (Bogad, 2008).

La variabilidad genética presente en la población humana, como así también el grado de estructuración que puede existir, genera que las frecuencias alélicas difieran entre las poblaciones o grupos étnicos (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014). Por lo cual, en las fases de desarrollo, las investigaciones en el área de la farmacogenética se focalizan en obtener resultados poblacionales (Bogad, 2008). Conocer qué alelos y con qué frecuencia están presentes en la población de interés es siempre el primer paso para la aplicación de la farmacogenética (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014).

Dado que el efecto de los ISRS radica en bloquear al transportador de serotonina, aumentando en consecuencia la serotonina sináptica que interactúa con receptores de serotonina pre y post-sinápticos, tanto estos receptores como el transportador pueden contribuir a los efectos serotoninérgicos adversos, por lo cual, los polimorfismos

hallados en los genes que los codifican pueden utilizarse como biomarcadores genéticos capaces de predecir la respuesta al tratamiento (Keers y Aitchison, 2011; Kohen *et al.*, 2008). De particular interés es el estudio de dos polimorfismos detectados en el gen que codifica para el transportador de serotonina (5-HTT) (Keers y Aitchison, 2011; Kohen *et al.*, 2008; Malhotra *et al.*, 2004) y uno en el que codifica para el receptor de serotonina 2A (5-HTR2A) (Keers y Aitchison, 2011; Malhotra *et al.*, 2004).

EL 5-HTT es codificado por el gen *SLC6A4*, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en la región q11.2, consta de 40 Kb y se compone de catorce exones (Smits *et al.*, 2004). Este gen presenta dos polimorfismos: 5-HTTPR, que consiste en una inserción/delección de 44 pb en la región promotora y genera dos variantes alélicas, una de brazo corto (S) y una de brazo largo (L) (Gonda *et al.*, 2006; Caspi *et al.*, 2003) y 5-HTTVNTR caracterizado por 9, 10 o 12 copias de una región de 16-17 bp en el intrón 2 (Smits *et al.*, 2004); las variantes cortas se asocian a una menor transcripción del gen y a una menor concentración y funcionalidad de la proteína (Smits *et al.*, 2004; Caspi *et al.*, 2003; Hranilovic *et al.*, 2004; Drtilkova *et al.*, 2010).

El gen que codifica para el receptor 2A de serotonina, *5-HTR2A*, se localiza en el cromosoma 13q14-q21. Está conformado por tres exones y abarca 20 kb. Uno de los polimorfismos más estudiados en relación a la eficacia del tratamiento con antidepresivos del tipo ISRS es el SNP (polimorfismo de nucleótido simple) G/A en la posición 1438 [rs6311] de la región promotora (Martinez-Barrondo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Existen estudios que asocian la variante alélica G con una disminución de la expresión del receptor, y a la vez, los portadores del alelo G suelen ser los que presentan mayores efectos adversos a estos fármacos (Kim *et al.*, 2008; Stevenson y Bishop, 2013). Como referencia de lo que sucede en Argentina, una investigación reciente llevada a cabo en la ciudad de Rosario determinó la distribución alélica y genotípica del 5-HTTLPR en la población local, obteniendo una frecuencia para el genotipo LL del 29%, para el genotipo SS del 23% y para el genotipo SL del 48% y por ende una frecuencia del alelo S mayor (53%) que del alelo L (47%) (Ostera *et al.*, 2014). Cabe destacar que es la única publicación encontrada hasta el momento que evalúa la frecuencia génica de este polimorfismo en el país.

Dada la importancia de estudios de determinación de frecuencias alélicas y genotípicas en investigaciones de

farmacogenética, y dada la escasez de estudios que evalúan la distribución poblacional de estos polimorfismos a nivel nacional, se plantea validar metodologías de Biología Molecular que permitan estudiar los polimorfismos 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR del transportador de serotonina y el SNP 1438 A/G del receptor 2A de serotonina para su aplicación en el estudio de frecuencias alélicas y genotípicas en una muestra de la población marplatense.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras de pacientes*

Se extrajo sangre periférica de 384 pacientes ambulatorios. La sangre fue extraída por punción venosa (antebrazo) y recolectada en un tubo de plástico estéril con anticoagulante EDTA. Las muestras fueron elegidas aleatoriamente de un conjunto de muestras del Laboratorio de Análisis Fares Taie, utilizadas para estudios genéticos desde 2013 a 2015. La población estudiada tuvo una edad media de 45 años, siendo 25 % hombres y 75 % mujeres. Todos los pacientes dieron consentimiento escrito voluntario para participar de estudios genéticos.

### *Extracción de ADN*

Se procedió a extraer ADN de las muestras recolectadas a partir de 200  $\mu$ l de sangre entera mediante el kit comercial "ADN High Pure PCR Template preparation Kit" (Roche, Bs.As., Argentina) según instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue conservado a  $-20$  °C hasta su utilización.

### *Cuantificación de ADN*

Se llevó a cabo la cuantificación de ADN presente en las muestras extraídas mediante el equipo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), utilizando el termociclador en tiempo real Rotor Gene Q Series según indicaciones del fabricante. Todas las muestras utilizadas en este estudio presentaron una concentración de ADN entre 8 y 140 ng/ $\mu$ l de ADN. En las reacciones de PCR se utilizaron entre 20 y 50 ng de ADN.

### *Genotipificación de los polimorfismos del transportador y receptor 2a de serotonina*

Con el fin de estudiar los polimorfismos 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR y el SNP 1438 A/G del 5-HTR2A se comenzó por poner a punto metodologías para la detección

de los mismos en base a datos bibliográficos. El primer paso consistió en corroborar si los cebadores encontrados en la bibliografía amplificaban específicamente la región correspondiente al gen de interés mediante la utilización del *Software* de acceso libre *Primer BLAST* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) contra el genoma humano.

### *Polimorfismos del 5-HTT*

Mediante una búsqueda bibliográfica se eligieron diferentes sets de cebadores para realizar la puesta a punto de las amplificaciones por PCR; los **cebadoresseleccionados** figuran en la Tabla 1. Luego de realizar pruebas de validación con los distintos pares de cebadores se seleccionaron para los estudios de genotipificación del polimorfismo 5-HTTLPR los que amplifican un fragmento de 181 pb para el alelo L y de 137 pb para el alelo S. En el caso del polimorfismo 5-HTTVNTR se seleccionaron para los estudios de genotipificación los que amplifican un fragmento de 386 pb para el alelo 12 y de 356 pb para el alelo 10 y 341 pb para el alelo 9. Una vez puestas a punto las reacciones de PCR para la genotipificación de ambos polimorfismos del transportador de serotonina, se estudiaron 384 pacientes ambulatorios.

Las amplificaciones por PCR del polimorfismo 5-HTTLPR se llevaron a cabo en un termociclador VERITI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con una mezcla preformada (2G Kapa multiplex Biosystems, Kapa Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción, exceptuando **cebadoresmoldes** y agua. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C y 30 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y 15 s a 72 °C. Mientras que las reacciones de PCR del polimorfismo 5-HTTVNTR realizaron en el equipo Rotor Gene (Qiagen, Hilden, Alemania) con una mezcla preformada (Kapa Fast, Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción exceptuando cebadores, moldes,  $Cl_2Mg$  y agua. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C y 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 61 °C y 20 s a 72 °C. En ambos casos el volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 $\mu$ l. Los alelos fueron distinguidos por su peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa 3,5 % teñido con bromuro de etidio y revelado por luz UV. En cada reacción de PCR, se procesaron como controles internos muestras heterocigotas (LS, 10:12) y homocigotas (LL y SS; 10:10 y 12:12) para ambos polimorfismos.

**Tabla 1.** Pares de cebadores utilizados para la puesta a punto de la detección del 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR.

Polimorfismo		Secuencia de <i>primers</i> (5'→3')	Tamaño del amplicón esperado	Referencia
5-HTTLPR	Fw	TTCACCCCTCGCGGCAT	Alelo L 528 pb	Martinez-Barrondo <i>et al.</i> , 2005
	Rv	GGGGATATTGGGGGTTGCAGGG	Alelo S 484 pb	
	Fw	GGCGTTGCCGCTCTGAATGC	Alelo L 529 pb	Haase <i>et al.</i> , 2013
	Rv	GAGGGACTGAGCTGGACAACCA	Alelo S 491 pb	
	Fw	GCAACCTCCCAGCAACTCCCTGTA	Alelo L 181 pb	Hu <i>et al.</i> , 2006
	Rv	GAGGTGCAGGGGGATGCTGGAA	Alelo S 137 pb	
5-HTTVNTR	Fw	GTCAGTATCACAGGCTGCGAG	Alelo 9 254 pb	Kohen <i>et al.</i> , 2008
	Rv	TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG	Alelo 10 269 pb	
			Alelo 12 299 pb	
	Fw	TGGATTCCTTCTCTCAGTGATTGG	Alelo 9 345 pb	Maestrini <i>et al.</i> , 1999
	Rv	TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG	Alelo 10 360 pb	
			Alelo 12 390 pb	
	Fw	ATACTGGTAGGGTGCAAGGAGA	380 pb – no amplifica en intrón	Drtilkova <i>et al.</i> , 2010
	Rv	CTCTGAATGCCAGCACCTAAC		
	Fw	GTCAGTATCACAGGCTGCGAG	Alelo 9 297 pb	Martinez-Barrondo <i>et al.</i> , 2005
	Rv	TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG	Alelo 10 282 pb Alelo 12 302 pb	
Fw	TGGATTCCTTCTCTCAGTGATTGG	Alelo 9 341 pb	Maestrini <i>et al.</i> , 1999	
Rv	TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG	Alelo 10 356 pb Alelo 12 386 pb		

#### Polimorfismo 1438 GA del receptor 2A de serotonina

El SNP 1438 A/G en el gen *5-HTR2A* se analizó utilizando la metodología de PCR-RFLP mediante digestión con la enzima de restricción MspI. Las amplificaciones se llevaron a cabo con el par de cebadores Fw 5'CTGGGTGGCATATTTCTGCT'3 y Rv 5'ACCAAGGGACTCCTGGTTTC'3 (Kim *et al.*, 2008) en un termociclador VERITI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con una mezcla preformada (2G Kapa multiplex Biosystems, Wilmington, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción, exceptuando cebadores, moldes y agua, en un volumen final de 20 µL. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C y 30 ciclos de 25 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 20 s a 72 °C. El fragmento amplificado de 513 pb fue digerido con la enzima MspI durante 3 hs a 37 °C, verificándose previamente la presencia del amplicón mediante una corrida electroforética con la mitad del volumen de reacción. Posterior a la digestión enzimática, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 3,5

% teñido con bromuro de etidio y se reveló por Luz UV, diferenciando los alelos por el patrón de bandas obtenido: dependiendo la presencia o ausencia del sitio de corte para MspI se obtiene un fragmento de 513 pb para el alelo A o dos fragmentos de 331 pb y 182 pb para el alelo G. En cada reacción de PCR se procesaron como controles internos muestras heterocigotas (GA) y homocigotas (GG y AA).

Con el fin de corroborar la correcta genotipificación, algunos productos de PCR de 513 pb correspondientes a pacientes con distinto genotipo según PCR-RFLP, fueron purificados y secuenciados. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en un equipo CEQ 2000XL de Beckman Coulter (secuenciador de ADN de 8 capilares de 33 cm de longitud, 75µm id), siguiendo los protocolos del fabricante. Una vez recibidas las secuencias se analizaron los electroferogramas mediante el programa *Sequence Scanner V1.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Adicionalmente, se planeó evaluar la utilidad de una metodología post-PCR de *High Resolution Melting* (HRM) para la detección del polimorfismo 1438 A/G

del *5-HTR2A* a partir del diseño de cebadores propios mediante el *Software Primer Premier* (PREMIER Biosoft International). Como primer paso, en algunas muestras ya genotipificadas por PCR-RFLP o secuenciación, se realizó una amplificación por PCR en tiempo real con el intercalante fluorescente Evagreen (Kapa Fast HRM, Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y con los cebadores diseñados (Fw 5'CACTGTTGGCTTTGGATG'3 y Rv 5' TTAGGCTGAAGGGTGAAG'3) que permitieron amplificar un fragmento de 99 pb que contiene al polimorfismo bajo estudio. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min de 95 °C y 45 ciclos de 10 s a 95 °C, 15 s a 54 °C y 20 s a 72 °C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó el análisis por HRM mediante el programa Rotor Gene Q Series.

#### Análisis estadístico

En base a los resultados obtenidos mediante la genotipificación de los pacientes ambulatorios se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos bajo estudio evaluando su apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg bajo el test de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

#### *Puesta a punto de metodologías para la detección de los polimorfismos del receptor 2A y transportador de Serotonina*

##### *Polimorfismos del 5-HTT*

Para estudiar el 5-HTTLPR se comparó la utilidad de tres juegos de cebadores. El único par de cebadores que permitió la correcta genotipificación fue el utilizado por Hu *et al.* (2006) que amplifican fragmentos de 181 pb para el alelo L y de 137 pb para el alelo S. Al utilizar los cebadores descritos por Haase *et al.* (2013) se observaron bandas inespecíficas en todas las temperaturas del gradiente probado (62 °C, 63 °C, 64 °C y 65 °C). El último par de cebadores probado reportados por Martínez-Barrondo *et al.* (2005) mostró inespecificidad en todas las pruebas. Adicionalmente, mostraron inconsistencias en cuanto a la región amplificada al estudiarlos mediante *software* de bioinformática o mediante análisis bioinformático. En el caso del polimorfismo correspondiente al VNTR del intrón 2 del gen *SLC6A4* se utilizaron para la puesta a punto un total de 5 juegos de cebadores. Cuatro combinaciones

se obtuvieron por bibliografía, mientras que el quinto par, que fue el seleccionado, se obtuvo tras combinar los cebadores *Forward* y el *Reverse* de dos de los trabajos anteriores. De los cuatro pares de cebadores analizados sólo dos amplificaron la región de interés, permitiendo identificar los distintos alelos en base a su peso molecular. Debido a la poca intensidad de las bandas obtenidas al utilizar el set de cebadores empleados por Martínez-Barrondo *et al.* (2005) se decidió seleccionar para la genotipificación el juego de cebadores que resultó de la combinación propia, mediante el cual se obtuvieron bandas de 386 pb para el alelo 12 y de 356 pb para el alelo 10. A diferencia de lo que ocurrió para el 5-HTTLPR, tras examinar el fragmento que amplifica cada juego de cebadores mediante *software* bioinformáticos, se observó que el obtenido de la fuente Drtilkova *et al.* (2010), si bien amplifica una región del gen en estudio, no se corresponde con el segmento donde se localiza el polimorfismo de interés.

##### *Polimorfismo 1438 GA del receptor 2A de serotonina*

Para el estudio del polimorfismo 1438 G/A del receptor 2A de serotonina en todos los pacientes, se utilizó la técnica PCR-RFLP.

Como se describió en la sección Materiales y Métodos, se planeó desarrollar una metodología de HRM para la detección del polimorfismo 1438 A/G del *5-HTR2A*. En la validación de esta técnica se diseñaron cebadores propios y se evaluaron los resultados de la amplificación en base a los niveles de fluorescencia observados tras la amplificación PCR *Real Time* y además se corroboró la correcta amplificación mediante la corrida electroforética de los productos de PCR. Una vez optimizada la reacción, se llevó a cabo el análisis de *melting* de alta resolución post-PCR con un rango de temperatura de entre 75-90 °C; se esperaba que las muestras procesadas pudieran ser clasificadas según el genotipo para el polimorfismo de interés. Para el análisis en los ensayos de HRM, como primera medida, luego de cada amplificación se normalizaron las lecturas de fluorescencia. Para ello se utilizó el *software* Rotor Gene Q Series que permitió identificar áreas de pre- y post-*melting* en la zona estable de fluorescencia. Luego, se normalizó con respecto a un control homocigota (GG-AA) y a un control heterocigota y el *software* Rotor Gene Q Series estableció el genotipo de cada muestra analizada.

Si bien la amplificación y el análisis post-PCR pudo desarrollarse, la genotipificación por esta técnica no fue correcta para algunas muestras. En base al análisis de la

secuencia de estos pacientes se comprobó que aquellos que fueron clasificados de forma errónea presentaban a 18 pb del 1438 G/A, el SNP rs6306 (1420 T/C) el cual muestra poca asociación con la respuesta a los ISRS (Cusin *et al.*, 2002). Según la base de datos su frecuencia es bastante baja a nivel mundial, varía entre el 0 % y el 12 % (ALFRED, 2016a). La presencia del SNP 1420T/C, genera un cambio en la curva de *melting* semejante al generado por el SNP 1438 G/A, impidiendo la correcta clasificación de las muestras mediante HRM. De modo que la misma no es la técnica adecuada para la genotipificación del SNP 1438 G/A dada la presencia del otro SNP en nuestra población. Cabe recalcar que es la primera vez que se reporta la existencia de este SNP en la población argentina. Como consecuencia de lo anteriormente descripto, para

la genotipificación en el presente estudio se utilizó en su totalidad la metodología PCR-RFLP.

#### *Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas*

Una vez que se pusieron a punto las metodologías para la genotipificación de los tres polimorfismos objeto de estudio del presente trabajo, se obtuvieron los perfiles genéticos de las 384 muestras procedentes de pacientes ambulatorios, permitiendo calcular las frecuencias alélicas y genotípicas y por ende, lograr estimar la distribución de frecuencias de estos polimorfismos en la población marplatense (Tabla 2). Para el 5-HTTVNTR, el alelo 9 fue hallado en un sólo paciente con genotipo 10:9, por lo cual no se tuvo en cuenta para el cálculo de frecuencias.

**Tabla 2.** Frecuencias alélicas y genotípicas y cálculo de EWH en los polimorfismos de transportador y receptor 2A de serotonina en la población marplatense.

Polimorfismo	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)		EWH	
	SS	SL	LL	S	L	gL	X <sup>2</sup>
5-HTTLPR	21%	61%	18%	51%	49%	1	16,65
	10:10	10:12	12:12	10	12		
5-HTTVNTR	17%	41%	42%	37,5%	62,5%	1	5,43
	GG	AG	AA	G	A		
1438 G/A	36%	47%	17%	59,5%	40,5%	1	0,47

## DISCUSIÓN

El Proyecto Genoma Humano, publicado en 2003, permitió conocer la secuencia completa del ADN y realizar estudios sobre la estructura y funcionalidad de los genes. Con el conocimiento de la existencia de la gran variación interindividual, se comenzaron a analizar y comprender por qué a pesar del desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, aparentemente más seguros y eficaces, sigue existiendo una gran variabilidad de respuesta entre los pacientes. A partir de estos nuevos avances se vislumbró la idea de comenzar a personalizar los tratamientos en base al

perfil genético del paciente, que es lo que se conoce como farmacogenética. Dado que el área farmacogenética se encuentra aún en desarrollo en la mayoría de las disciplinas en las que se aplica, las investigaciones en este campo se focalizan inicialmente en obtener resultados poblacionales (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014; Keers y Aitchison, 2011; Malhotra *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se lograron poner a punto metodologías que permitieron estudiar los polimorfismos mencionados del transportador y receptor 2A de serotonina distinguiendo con exactitud los genotipos de todas las muestras analizadas. Se debe recalcar la importancia de

cumplir con todos los pasos necesarios para la optimización de las reacciones de PCR en el momento de la puesta a punto. Los análisis bioinformáticos son fundamentales a la hora de seleccionar los mejores cebadores para poder validar estas reacciones. Como se describió en la sección de resultados, se encontraron discrepancias entre el análisis *in silico* y el material bibliográfico hallado para la genotipificación de las dos variantes alélicas del transportador de serotonina, 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR. Además en este estudio ciertos juegos de cebadores no amplificaron los productos de PCR esperados de manera eficiente, lo que demuestra que las condiciones óptimas de una misma reacción, ya sea por el tipo de termociclador o la mezcla de reacción utilizada, pueden no ser necesariamente idénticas entre un laboratorio y otro.

El análisis llevado a cabo en el presente trabajo constituye el primer trabajo en nuestro país en el cual se estudian simultáneamente las frecuencias alélicas y genotípicas de estos tres polimorfismos en una muestra representativa de nuestra población. Si se comparan las frecuencias alélicas encontradas en la población marplatense para cada polimorfismo estudiado con datos hallados en la bibliografía, se puede ver que lógicamente los valores están dentro del rango esperable en las poblaciones americanas y europeas, pero difiere en gran medida con los encontrados en las poblaciones africanas y asiáticas (Sitte y Freissmuth, 2006; ALFRED, 2016b). Para el 5-HTTLPR, si se analizan las frecuencias tanto alélicas como genotípicas obtenidas en marplatenses en relación a las obtenidas para la población rosarina, único estudio disponible a nivel nacional, se observa un mayor porcentaje de heterocigotas en la población marplatense, mientras que el alelo S se ve mayormente representado en ambas poblaciones en comparación al alelo L (Ostera *et al.*, 2014). Al igual que en otras poblaciones, el alelo 9 del 5-HTTVNTR tiene muy baja frecuencia (Sitte y Freissmuth, 2006), por lo que se debería evaluar su utilidad en el desarrollo de tests farmacogenéticos para la respuesta a los ISRS.

Sería relevante desarrollar en un futuro un test farmacogenético que permita identificar el mejor tratamiento para los pacientes en base a los polimorfismos aquí analizados, ya que las variantes alélicas más frecuentes en los pacientes psiquiátricos no respondedores se encuentran representadas en la población general. Esto estaría indicando que es probable que un gran porcentaje de la población pueda llegar a presentar efectos adversos o no responder al tratamiento con ISRS en caso que lo requieran en algún momento de su vida.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALFRED (2016a) [http://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A\\_working.asp?siteuid=SI479410Z](http://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A_working.asp?siteuid=SI479410Z) Accessed november 2016.
- ALFRED (2016b) [https://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A\\_working.asp?siteuid=SI479444G](https://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A_working.asp?siteuid=SI479444G). Accessed november 2016.
- Artiga F. (1997) El transportador de serotonina como diana terapéutica. *Rev. Psicofarm.* 2: 13-19.
- Bogad J.A. (2008) Revisión sistemática de estudios farmacogenéticos de antipsicóticos y antidepresivos. Universidad Nacional de Asunción, Uruguay.
- Caspi A., Sugden K., Moffitt T.E., Taylor A., Craig I.W., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R.A. (2003) Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Rev. Science* 301 (5631): 386-389. doi: 10.1126/science.1083968.
- Cusin C., Serretti A., Zanardi R. (2002) Influence of monoamine oxydase A and serotonin receptor 2A polymorphisms in SSRIs antidepressant activity. *Int. J. Neuropsychopharmacology* 5: 27-35. doi:10.1017/S1461145701002711.
- Daar A.S., Singer P.A. (2005) Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health. *Nat. Rev. Genet.* 6 (3): 241-246. doi: 10.1038/nrg1559.
- Drtilkova I., Neumannova M., Theiner P., Filova A., Lochman J., Castulik L., Sery O. (2010) The VNTR Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene Predisposes Czech Boys to Hyperkinetic Disorders. *Act. Nerv. Super Rediviva* 52 (2): 157-162.
- Gonda X., Rihmer Z., Zsombok T., Bagdy G., Akiskal K.K., Akiskal H.S. (2006) The 5HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene is associated with affective temperaments as measured by TEMPS-A. *Rev. J. Affect. Disord.* 91 (2-3): 125-131. doi: 10.1016/j.jad.2005.12.048.

- Haase C.M., Saslow L.R., Bloch L., Saturn S.R., Casey J.J., Seider B.H., Lane J., Coppola G., Levenson R.W. (2003) The 5-HTTLPR polymorphism in the serotonin transporter gene moderates the association between emotional behavior and changes in marital satisfaction over time. *Emotion* 13 (6): 1068-1079. doi: 10.1037/a0033761.
- Hranilovic D.L., Stefulj J., Schwab S., Borrmann-Hassenbach M., Albus M., Jernej B., Wildenauer D. (2004) Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol. Psychiatry* 55 (11): 1090-1094. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.01.029.
- Hu X.Z., Lipsky R.H., Zhu G., Akhtar L.A., Taubman J., Greenberg B.D., Xu K., Arnold P.D., Richter M.A., Kennedy J.L., Murphy D.L., Goldman D. (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 78 (5): 815-826. doi: 10.1086/503850.
- Keers R., Aitchison K.J. (2011) Pharmacogenetics of antidepressant response. *Expert Rev. Neurother.* 11 (1): 101-125. doi: 10.1586/ern.10.186.
- Kim K., Woo H., Lim S. (2008) Association Study of a Serotonin Receptor 2A Gene 1438A/G Polymorphism and Anxiety-Related Traits. *Rev. Psychiatry Invest.* 5: 244-246. doi: 10.4306/pi.2008.5.4.244.
- Kohen R., Cain K.C., Mitchell P.H., Becker K., Buzaitis A., Millard S.P., Navaja G.P., Teri L., Tirschwell D., Veith R. (2008) Association of serotonin transporter gene polymorphisms with poststroke depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 65 (11): 1296-1302. doi: 10.1001/archpsyc.65.11.1296.
- Looper K.L. (2007) Potential medical and surgical complications of serotonergic antidepressant medications. *Psychosom.* 48 (1): 1-9. doi: 10.1176/appi.psy.48.1.1.
- Maestrini E., Lai C., Marlow A., Matthews N., Wallace S., Bailey A., Cook E.H., Weeks D.E., Monaco A.P. (1999) Serotonin transporter (5-HTT) and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit  $\beta$ 3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. *Am. J. Med. Genet.* 88 (5): 492-496.
- Malhotra A.K., Murphy G.M. Jr., Kennedy J.L. (2004) Pharmacogenetics of Psychotropic Drug Response. *Am. J. Psychiatry* May, 161 (5): 780-796. doi: 10.1176/appi.ajp.161.5.780.
- Martinez-Barrondo S., Saiz P.A., Morales B., Garcia-Portilla M.P., Coto E., Álvarez V., Bobes J. (2005) Serotonin gene polymorphisms and panic disorder. *Actas Esp. Psiquiatr.* 33 (4): 210-215.
- Nelson M.R., Bryc K., King K.S., Indap A., Boyko A.R., Novembre J. (2008) The Population Reference Sample, POPRES: a resource for population, disease and pharmacological genetics research. *Am. J. Hum. Genet.* 83: 347-358. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.005.
- Ostera D., Pugliesi M., Scrigna J. (2014) Determinación de la frecuencia alélica de polimorfismo en la región promotora del gen del transportador de serotonina. *Informe ALAC* 2: 14.
- Pereira M.A., Cavallari L.H., Johnson J.A. (2014) Warfarin pharmacogenetics: an illustration of the importance of studies in minority populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95 (3): 242-244. doi: 10.1038/clpt.2013.209.
- Rakel D. (2009) *Medicina integrativa*. In: Elsevier (Ed.) *Depresión*. 2nd Edition. Barcelona, España, pp. 75-83.
- Sitte H., Freissmuth M. (2006) *Neurotransmitter Transporters*. Editorial Springer, Alemania, pp. 345.
- Smits K.M., Smits L.J.M., Schouten J.S.A.G., Stelma F.F., Nelemans P., Prins M.H. (2004) Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Mol. Psychiatry* 9 (5): 433-441. doi: 10.1038/sj.mp.4001488.
- Stevenson J.M., Bishop J.R. (2013) Antidepressant Tolerability and Potential Clinical Implications of Serotonin-2A Genotypes. *Clin. Pharmacol. Biopharm.* 2: 109. doi:10.4172/2167-065X.1000109.



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por FONTAR ANR 800/2011 N° 0094/11 (ANPCyT). Agradecemos especialmente a Martín Quintana y Sofía Pérez Maturo por sus útiles consejos en la corrección de este manuscrito.



## OBITUARY

### **Dra. Teresa E. Ciacci Angeleri de Negrotti (Tita)**

Morrison, Pcia. de Cordoba 18/08/1936 – Buenos Aires 21/04/2017



---

Se recibió de médica en el año 1962 en la UBA y, ya mostrando su inquietud por la investigación en Genética básica, ingresó como becaria de iniciación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en la Facultad de Ciencias de la UBA hasta 1964. En el período 1965-1967 continuó su formación en la Universidad de Londres como becaria del CONICET, obteniendo en 1965 el título de Doctora en Medicina. De 1968 a 1970 fue Investigadora Asociada en la Universidad Central de Venezuela.

En el año 1972 comenzó las actividades en Genética Médica ingresando al Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez como médica concurrente de la Sección de Genética bajo la dirección del Dr. Víctor Penschazadeh. También desde ese año y, en forma ininterrumpida, formó parte del equipo médico del Centro de Diagnóstico y Tratamiento de los Problemas de la Infancia “Dra. Lidia Coriat”. En 1977 Jefa de Genética Clínica en la Fundación de Genética Humana, cargo que ocupó hasta el año 1995.

En 1978 fue invitada por el Dr. Carlos Gianantonio a formar parte como médica genetista del Departamento de Pediatría del Hospital Italiano de Buenos Aires permaneciendo hasta 1989, lapso durante el cual también formó parte del Equipo Interdisciplinario de Malformaciones Craneofaciales del Departamento de Pediatría.

En 1989 y en forma continua se desempeñó como Docente de post-grado en la Asignatura de Genética Médica de la carrera de Especialización en Neurología Infantil de la Facultad de Medicina de la UBA, cursándose en el Servicio de Neuropediatría del Hospital Italiano bajo la dirección del Dr. Julio Castaño.

Siempre con ese entusiasmo por la docencia fue Prof. Adjunta en la Univ. del Salvador (1977-78 y 1982-84), Prof. Titular de Genética Humana en la Universidad del Museo Social Argentino (1977-79). Docente de la Escuela de Capacitación CePA (Secretaría de Educación del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires) para la formación de Educadores en la "Atención a la Diversidad", en favor de la integración escolar de niños con discapacidades (1998-1914).

Participó en más de 100 Cursos o Seminarios como docente, coordinadora y/o directora.

Uno podría continuar con el riquísimo recorrido de Tita de su inmensa trayectoria académica, dando lugar también a su producción científica en la cual ha sido autora de más de 50 trabajos publicados y/o presentados en reuniones científicas. A nivel de pertenencia a Sociedades Científicas fue Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Pediatría; Secretaria de la Junta Ejecutiva del Comité Nacional de Genética de la SAP durante tres períodos; Vocal del Comité de Discapacidades de la SAP; Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Genética bajo las presidencias del Dr. Alberto Solari y posteriormente del Ing. Agr. Carlos Mezzadra. Durante el período 1996-99 fue Miembro de la Comisión Coordinadora de la Sección de Genética Humana de la SAG (SEGEHU). En todas las funciones que desempeñó en la SAG, su deseo más profundo fue el de colaborar y congregarse a todos los profesionales dedicados a la Genética humana del país. Accedió a los títulos de Especialista en Genética Médica del Colegio Médico de la Pcia. de Buenos Aires, 1983. Especialista en Genética Médica de la Sociedad Argentina de Genética y Ministerio de Salud y Acción Social, 1991. Reválida del título de Especialista de la Sociedad Argentina de Genética, 1997. Certificación del título de Especialista de la Academia Nacional de Medicina, 1999.

Sin duda y por todos conocida, "Tita" ha sido una persona excelente, íntegra, cuidadosa y ética con una gran vocación de servicio y exigencia en el trabajo. Su total dedicación al paciente la llevó a estar siempre pendiente del diagnóstico preciso y certero comprometiéndose a nivel personal y, de los profesionales médicos genetistas y de laboratorio, vinculados para alcanzar tal fin.

Muchos somos los que desde distintos ámbitos, tiempo y circunstancias, hemos tenido la suerte de conocerla profesionalmente y, compartir su calidad humana. Sólo queda decir que con su grandeza y ejemplo de vida, siempre estará con nosotros.

No queda otra que agregar algunos testimonios de sus colegas:

**Dr. Roberto Coco**, Fecunditas, Medicina Reproductiva: conocí a Tita cuando se incorporó al Hospital de Niños y considero que fue una persona admirable, de conducta intachable, con el juramento hipocrático acuñado a fuego en todo su ser y que no pudo abandonarlo hasta su partida. Para mí no fue para nada sorprendente que su hija Mariana me comentara que el día anterior de su partida le había dejado encargado, cuando la llamara la paciente tal, a la que tenía que asesorar, que no se olvidara de conectarla conmigo porque ella ya me había explicado qué hacer. Recuerdo muy bien que unos meses antes me había llamado telefónicamente porque deseaba presentármela personalmente, ya que su estado de salud era muy crítico. Lamentablemente su salud empeoró y no pudo concretar la reunión. Todo un ejemplo de profesionalismo, con una exquisita personalidad amigable!

**Dra. Patricia Kaminker**, Hospital de Niños Pedro Elizalde; SEGIR Centro de Reproducción: A todo lo expresado, refuerzo expresiones de afecto, profundo respeto y admiración que siempre sentí por Tita. Respecto al dolor de su ausencia está todo dicho, el mismo permanece en uno.

**Dra. Ana Pantano**, Laboratorio Análisis Genéticos: Compartía con ella y valoraba su gran calidad humana, además de su preocupación y exigencia profesional en la veracidad de los informes genéticos que se derivaban, siempre necesarios para un diagnóstico preciso y correcto. El recuerdo de todo su quehacer me produce una gran emoción.

**Dra. Rosa Nágel**, ex-Invest. Principal de CONICET y ex-Prof. Titular UBA: conocí a Tita (Dra. T. Negrotti) en la cátedra de Genética de la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales (años 1963-1964). Ella trabajaba en Citogenética, yo en Genética bacteriana. Años más tarde (1970-1971) Tita trabajó en investigación en mi laboratorio en la UCV, Caracas, y juntas publicamos un trabajo (Negrotti T. y Nagel de Zwaig R. (1972). *Interactions between colicinogenic factor B and fertility factors. Isolation of a mutant F-lac factor insensitive to the effect of ColB. Genetics, 70; 205-213*). Nuestros caminos académicos se volvieron a acercarse nuevamente (1979-1985) en la Fundación de Genética Humana, en Buenos Aires, pero esta vez, en distintas áreas. Ella estaba a cargo del área de Genética Clínica y yo, a cargo del área de Investigación en Toxicología Genética. Compartimos en las distintas instancias muchas charlas de tipo profesional y académico, muchos buenos momentos y algunos también difíciles. Ahora solo me resta expresar el mejor de los reconocimientos a quien siempre valoré como una gran profesional, gran persona y gran amiga.

**Dr. Víctor Penchazsadeh**, Universidad Nacional Tres de Febrero: Recuerdo a Tita Negrotti como una persona ejemplar en lo personal, por lo dulce y suave de su interacción con colegas y pacientes, y en lo profesional, por su interés académico y humano por el avance de la Genética Clínica. Coincidimos en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez a comienzo de los años setenta, ella llegada de postgrados en Londres y Caracas, y yo viniendo de mi formación en Genética Médica en el Johns Hopkins. Trabajamos juntos armando el Servicio de Genética del Niños, junto a otras jóvenes pediatras interesadas en Genética, hasta que debí partir al exilio en diciembre de 1975. Recuerdo también que, cuando retornó la democracia y pude comenzar a venir de visita al país, Tita era una interlocutora de lujo en temas científicos y sociales, y participamos juntos en muchos eventos y cursos para difundir los conocimientos de Genética entre los profesionales de Salud. Su ausencia será muy sentida por todos los que la conocimos.

**Dra. Susana E. Sommer**, profesora de Ética en la Maestría de Biología Molecular Médica, UBA: Conocí a Tita Negrotti en 1962 (ella era pediatra y yo estudiante de biología) en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a partir de allí compartimos distintos momentos amistosos y profesionales. Así, fue que trabajamos en la misma institución, la Fundación de Genética Humana, donde ella era jefa de clínica médica.

Tita Negrotti fue una amiga dilecta y una genetista destacada. Su inteligencia, su probidad y su calidez humana fueron proverbiales, así como su generosidad con los que fueron sus discípulos. No la olvidaremos!

**Dra. Claudia Arberas**, Genética, Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez” Buenos Aires:

“Querida Tita, hace unos días nos enteramos de tu fallecimiento. Todos los que tuvimos el placer de conocerte no podemos quedar inertes frente a lo irreparable de esta partida. Tu gran sencillez, tu calidad como profesional y tu integridad como persona son solo algunas simples palabras que intentan apenas resumir lo que fuiste. Como jefa fuiste líder, como compañera una amiga, como persona un ejemplo. Gracias por dejarnos tu humor, tu pensamiento sagaz, tu calidez. Hasta siempre”.

**Dra. Graciela del Rey**

Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá”. (CEDIE). CONICET. FEI.  
División de Endocrinología, Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez” Buenos Aires.







**BAG**  
Journal of Basic & Applied Genetics