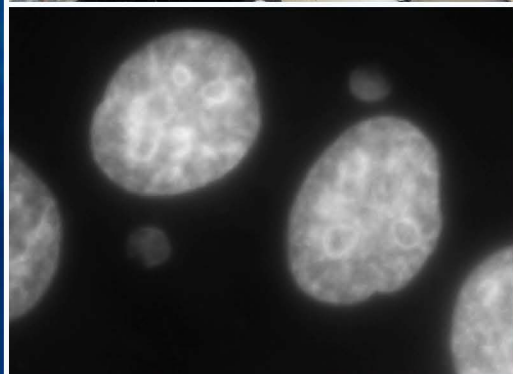




Journal of Basic & Applied Genetics

(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**



COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro

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

Fac. de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
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).
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:

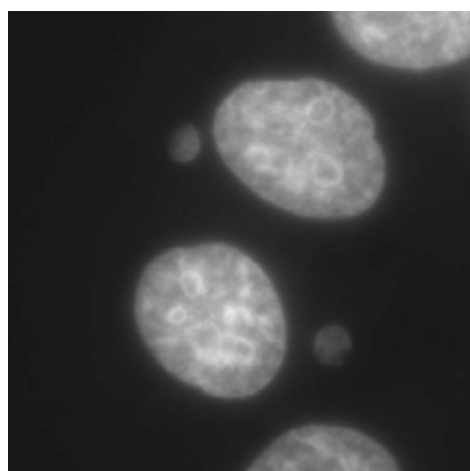
Dra. María de las Mercedes Echeverría

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



Ejemplares de la especie *Pygoscelis adeliae*.

Autor: Lic. Marcos Cenizo
(Instituto Antártico Argentino)



Núcleos con micronúcleos de células HEP-2.

Autora: Dra. Nancy Andrioli



Majada de ovinos Criollos, Buenos Aires.

Autora: Ing. Sabrina Peña

ÍNDICE

7 - 13

Article 1 - opinion

LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA VARIABILIDAD GENÉTICA: DOS CONCEPTOS DIFERENTES ASOCIADOS AL GERMOPLASMA Y AL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL

GENETIC DIVERSITY AND GENETIC VARIABILITY: TWO DIFFERENT CONCEPTS ASSOCIATED TO PLANT GERMPLASM AND BREEDING

Pedro Rimieri

15 - 24

Article 2 - research

HEP-2 CELL LINE AS AN EXPERIMENTAL MODEL TO EVALUATE GENOTOXIC EFFECTS OF PENTAVALENT INORGANIC ARSENIC

HEP-2 COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DEL ARSÉNICO INORGÁNICO PENTAVALENTE

Andrioli N.B., Chaufan G., Coalova I., Ríos de Molina M.C., Mudry M.D.

25 - 27

Article 3 - research

UN MÉTODO MOLECULAR RÁPIDO, NO INVASIVO Y SIMPLE PARA DETERMINAR EL SEXO EN PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS

A RAPID, NON INVASIVE AND SIMPLE MOLECULAR METHOD FOR SEX DETERMINATION IN PYGOSCELIS PENGUINS

Santos M.R., Santos M.M., Terán E.M., Bailliet G., Juárez M.A.

29 - 42

Article 4 - research

MIGRATIONS, ADMIXTURE AND GENETIC DIVERSITY IN CENTRAL ARGENTINIAN PATAGONIA: ANALYSIS OF AUTOSOMAL ALU POLYMORPHISMS

MIGRACIONES, MESTIZAJE Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA PATAGONIA CENTRAL ARGENTINA: ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS AUTOSÓMICOS ALU

Parolin M.L., Zanetti D., Calò C.M., Esteban E., Avena S., Carnese F.R., Moral P.

43 - 55

Article 5 - research

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CUATRO POBLACIONES DE OVINOS CRIOLLOS DE ARGENTINA

GENETIC CHARACTERIZATION OF FOUR POPULATIONS OF ARGENTINIAN CREOLE SHEEP

Peña S., Martínez A., Villegas Castagnasso E., Aulicino M., Género E.R., Giovambattista G., Martínez R.D.

57 - 58

Obituary

DR. EDUARDO ALBERTO MOSCONE

LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA VARIABILIDAD GENÉTICA: DOS CONCEPTOS DIFERENTES ASOCIADOS AL GERMOPLASMA Y AL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL*

GENETIC DIVERSITY AND GENETIC VARIABILITY: TWO DIFFERENT CONCEPTS ASSOCIATED TO PLANT GERMPLASM AND BREEDING

Pedro Rimieri

Ex Investigador INTA en Mejoramiento Genético; Referente INASE; Director de Tesis y Jurado de Post-Grados.

*Adaptado de la Conferencia Francisco Sáez 2017, 46º Congreso Argentino de Genética, San Fernando del Valle, Catamarca, Argentina

primieri730@gmail.com

ABSTRACT

This paper differentiates plant genetic resources maintained *in situ* and *ex situ* for protection and conservation, from those resources that man collects, maintains and uses for his subsistence by developing cultivated varieties through any artificial selection method. The imprecision, confusion and distortion found in many papers related to the issue raised here with respect to terminology, its meaning, its scope and its consequences, motivated the development of this opinion work. In plant breeding working collections are used as a source of variability and adaptation. In this process, unfailingly, only a part of the genetic variability is used, which is restricted in each selective cycle since the purpose of this process is to obtain new cultivars. In the selection process there is always a loss of genetic variability with respect to the population that gave rise to it. The confusion mentioned with respect to the loss of genetic variability resides in the following: the greater probabilities of success in a plant breeding program will be associated to the availability of a wide genetic variability in the starting elite collection and not in the obtained cultivar. One of the reiterated concepts attributes the loss of genetic variability to the advent of new cultivars and the narrow genetic base that they represent. The loss of genetic variability is a consequence of the achievement of genetic progress in plant breeding. In this context, the respect for diversity in protected areas and agrobiodiversity in agricultural areas, is the way for producing profitable yields while maintaining the long-term productivity as a result of the implementation of plant breeding.

Key words: genetic variability, genetic diversity, plant breeding, plant genetic resources

RESUMEN

En este trabajo se diferencian a los recursos fitogenéticos *in situ* y *ex situ* para protección y conservación, de aquellos recursos que colecciona, mantiene y utiliza el hombre para su subsistencia desarrollando variedades cultivadas obtenidas por cualquier método de selección artificial. La imprecisión, confusión y distorsión encontradas en muchos trabajos relacionados al tema aquí planteado, con respecto a la terminología, su significado, sus alcances y sus consecuencias, motivaron el desarrollo de este trabajo de opinión. En mejoramiento, las colecciones de trabajo son utilizadas como una fuente de variabilidad y adaptación. En ese proceso de obtención de cultivares, indefectiblemente, se utiliza sólo una parte de la variabilidad genética del inicio, que se restringe en cada ciclo selectivo. La confusión mencionada con respecto a la pérdida de variabilidad genética se debe a que las mayores probabilidades de éxito en un programa de mejoramiento estarán asociadas a la disponibilidad de una amplia variabilidad genética en la colección de trabajo base del mejoramiento y no en el cultivar obtenido. La diversidad genética se conserva y protege en otro ámbito y con otras disciplinas. La variabilidad genética se re-utiliza y elimina selectivamente para obtener nuevos cultivares en los procesos de selección artificial. El hombre, al obtener variedades primitivas o nuevos cultivares modernos, siempre perdió variabilidad genética con respecto a la población que le dio origen, como consecuencia del mismo proceso selectivo. Ante ese contexto, respetando la biodiversidad, se puede mantener la productividad agrícola a largo plazo con el aporte concreto del mejoramiento genético.

Palabras clave: variabilidad genética, diversidad genética, fitomejoramiento, recursos fitogenéticos

Fecha de recepción: 24/11/2017
Fecha de aceptación de versión final: 3/12/2017

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se diferencian a los recursos fitogenéticos *in situ* y *ex situ* para protección y conservación, de aquellos recursos que colecciona, mantiene y utiliza el hombre para su subsistencia desarrollando variedades cultivadas a través de cualquier método de selección o de mejoramiento genético. En ese enfoque, tanto la protección de la diversidad como la aplicación productiva de técnicas mutagénicas, bioquímicas, moleculares y de ingeniería genética como herramientas del mejoramiento genético son compatibles y complementarias.

La imprecisión, confusión y distorsión encontradas en muchos trabajos relacionados al tema aquí planteado, con respecto a la terminología, su significado, sus alcances y sus consecuencias, motivaron el desarrollo de este trabajo de opinión, con argumentos basados en desarrollos básicos de la genética y de 50 años de experiencia tecnológica en el tema de la “variación” genética, complementados con análisis de las consecuencias productivas, sociales y ambientales.

Consideraremos dos disciplinas claras y complementarias: 1) la relacionada con la diversidad de los recursos genéticos por un lado, y 2) la de la domesticación y el mejoramiento genético por el otro lado. Definiremos a la domesticación como un proceso de selección para adaptación y al mejoramiento genético como el arte y la ciencia que mediante I+D+I mejoran y modifican a los genotipos, haciéndolos una oferta viable apta para producir (la introducción de algo nuevo).

La diversidad genética y la variabilidad genética incluyen estrategias diferentes, porque si bien ambas tienen como sustento a la genética, son esencialmente diferentes conceptualmente y prácticamente. Hay una tendencia marcada a confundirlas en el aspecto práctico, tal vez porque representan la “variación” de los recursos biológicos de las plantas por un lado y la utilizable en agricultura por otro, como también a preconceptos o creencias simples, que ignoran evidencias concretas de procesos tecnológicos complejos.

DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética, que en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad, se refiere a las variaciones heredables que ocurren en cada

organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie, en condiciones naturales más o menos estables. En ese contexto la genética de poblaciones y la evolución son las disciplinas que se ocupan de entender, describir y dar las pautas para que la biodiversidad se comprenda, se proteja y se conserve.

Históricamente, los estudios relacionados con diversidad genética en plantas han estado relacionados con datos botánicos principalmente. En la actualidad, con la agricultura más intensiva y el mayor uso de herramientas moleculares para el mejoramiento genético vegetal, la agrobiodiversidad, que se refiere a la biodiversidad del conjunto de organismos vivos en los sistemas agrícolas, comienza a analizarse y discutirse, y se ponen en práctica experimentos en zonas cultivadas más o menos frágiles. Como ejemplo, el Parque Chaqueño y la Región Pampeana, más y menos frágil respectivamente como ecosistemas en ambientes agrícolas, son motivo de estudio por diversos grupos.

Así como se utilizan nuevas herramientas de la biología molecular y de la genética molecular para producir más y más sustentablemente en la agricultura, las mismas son también de gran importancia para conservar la biodiversidad más eficientemente, detectando y conservando *in situ* comunidades o poblaciones representativas de la biodiversidad o definiendo con más precisión las llamadas colecciones núcleo o *core collections* en la conservación *ex situ* del germoplasma.

Finalmente y asociado con la biodiversidad, consideraremos la selección natural como uno de los tópicos más importantes relacionándola con la evolución y las poblaciones. Los trabajos de la primera generación de genetistas de poblaciones –en particular R.A. Fisher, S. Wright y J.B.S. Haldane, a través de sus modelos matemáticos (el campo de la genética estadística)– sintetizaron darwinismo, mendelismo y biometría dando origen a la genética de poblaciones. A partir de esa base teórica se desarrolló la genética cuantitativa como herramienta de la selección y del mejoramiento genético para caracteres poligénicos, esencia de la selección biométrica y mendeliana para la obtención de cultivares.

Ya veremos más adelante, que las variedades cultivadas (*cultivars* o cultivares) son poblaciones que, cada vez en mayor proporción, están formadas por un solo genotipo.

VARIABILIDAD GENÉTICA

Es imprescindible disponer de variabilidad genética en cualquier programa de mejoramiento. Nos referimos a la variabilidad disponible para seleccionar, que se encuentra en poblaciones o genotipos previamente adaptados, ya que la variabilidad genética de cada especie en estado silvestre, generalmente, no puede utilizarse directamente. Es así que en el mejoramiento se utilizan colecciones de trabajo como fuente de variabilidad y adaptación. En ese proceso, indefectiblemente, se utiliza sólo una parte de la variabilidad genética del inicio, que se restringe en cada ciclo selectivo. Recordemos que la finalidad de este proceso es la obtención de nuevos cultivares.

El mejoramiento genético es un largo proceso, esencialmente mendeliano y probabilístico, que termina con el desarrollo de cultivares. Un cultivar es una variedad cultivada, obtenida por selección artificial, mientras que las variedades botánicas corresponden a rangos taxonómicos entre subespecies y formas. Según el sistema reproductivo específico y la estructura genética de las poblaciones artificiales, hay cinco tipos de cultivares:

1. *Poblaciones* o *Cultivar Población*: mezcla de genotipos en especies autógamas, alógamas, o apomíticas.
2. *Sintéticos* o *Cultivar Sintético*: *idem* a Poblaciones pero sólo en alógamas, con control paterno en el origen (*Polycross*) o *Híbridos* con poca depresión del vigor en F_2
3. *Líneas* o *Cultivar Línea*, generalmente *un genotipo* (línea pura), aunque Jensen, en 1952, sugirió la mezcla de líneas y, al año siguiente, N. Borlaug abogó por el empleo de variedades multilíneas en trigo obtenidas por retrocruzamiento, con tolerancia diferencial a razas de roya con fenotipos y fenologías similares (*Isolíneas*).
4. *Híbridos F_1* o *Cultivar Híbrido* con dos *líneas* endocriadas paternas, con efecto de heterosis, *un solo genotipo*. A algunas variantes de esa fórmula se las denomina *Cultivar Semi-híbrido*.
5. *Clones* o *Cultivar Clon* cuando *un genotipo* (*dos genotipos* en frutales o especies injertadas), es seleccionado de cualquier estructura genética o es inducido por mutagénesis, y la multiplicación es asexual. La “semilla” es un propágulo obtenido por macro- o micropropagación.

La tendencia en la mayoría de las especies es hacia los Cultivares del Tipo 3, 4 y 5, con lo cual los cultivares más

modernos se van reduciendo paulatinamente a sólo tres tipos. Los genotipos de los cultivares, una vez implantados en los cultivos, se comportan como poblaciones, con efectos macro- y microambientales importantes para su expresión. Por la tendencia antes mencionada, esas poblaciones de plantas estarán, cada vez en mayor proporción, formadas por un solo genotipo.

LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL PROCESO DE SELECCIÓN ARTIFICIAL

El hombre, desde el proceso ancestral y empírico de selección cuando comenzó la agricultura hasta el mejoramiento genético más moderno, al obtener variedades primitivas (*landraces*) o nuevos cultivares modernos, siempre perdió variabilidad genética con respecto a la población original. Esta pérdida de variabilidad genética es como consecuencia del mismo proceso selectivo, sea éste simple o complejo. En el proceso selectivo complejo que involucra criterios y métodos de selección con cualquier grado de sofisticación o de uso de técnicas avanzadas presentes y en desarrollo, también ocurre esa pérdida de variabilidad. Esto último lo ampliaremos en los próximos párrafos.

A medida que los cultivares son más avanzados (según la clasificación ya presentada) y tengan un manejo agronómico intensivo, cuanto menos variabilidad genética tengan y mejor sinteticen las combinaciones superiores de efectos genéticos aditivos o de heterosis cercanos al potencial productivo de la especie, tanto mejor. Es por ello que los cultivares *híbrido F_1* , las *líneas puras* o los *clones*, son los que mejor concentran la variabilidad genética, ya sea en combinaciones superiores con alelos favorables y/o por interacciones génicas según las estructuras genéticas involucradas. Insistimos aquí que el sistema reproductivo de la especie y la estructura genética de la población representada en el cultivar, determinarán la naturaleza de los efectos genéticos y los tipos de acción génica. Entonces, es necesario resaltar aquí el objetivo y la función del mejoramiento genético: *El Mejoramiento Genético debe considerarse como un proceso de concentración de genes o combinaciones de genes favorables en un cultivar, que variará según sistemas reproductivos y estructuras genéticas específicas.*

La confusión mencionada con respecto a la pérdida de variabilidad genética reside en lo siguiente: las mayores probabilidades de éxito en un programa de mejoramiento estarán asociadas a la disponibilidad de una amplia variabilidad genética en la colección de trabajo base del mejoramiento y no en el cultivar obtenido. Y tampoco tiene que ver la pérdida de variabilidad con la pérdida de diversidad. La diversidad genética se conserva y protege en otro ámbito y con otras disciplinas. La variabilidad genética se re-utiliza y elimina selectivamente para obtener nuevos cultivares en los procesos de selección artificial de plantas. En síntesis, la variabilidad genética es el sustrato, la base o la condición de partida de la selección y del mejoramiento genético vegetal, mientras que la diversidad genética es el componente principal de la diversidad biológica, representa a los RRGG *in situ* y *ex situ* y al genoma de las especies que deben protegerse y conservarse.

EL CONTEXTO DE LA TECNOLOGÍA EN EL TEMA

En este punto nos referiremos al *Contexto*, como el conjunto de circunstancias que rodean a la terminología tratada y sin el cual no se puede comprender globalmente el tema. Ahora veremos las consecuencias con respecto a la confusión y distorsión encontrada en muchos trabajos con la terminología concerniente al contexto tecnológico en general y a la agricultura moderna e intensiva en particular. Uno de los conceptos reiterados en trabajos científicos y de divulgación, achacan la pérdida de variabilidad genética al advenimiento de nuevos cultivares en monocultivo y a la estrecha base genética que representan. Ahora bien, si eliminamos el verbo “achacar” de la frase anterior, lo que se expresa es cierto. Es más, es así técnica y conceptualmente como lo acabamos de mencionar y explicar en los puntos anteriores. Entonces, no nos queda más que preguntarnos: ¿por qué se distorsiona la información? Para responder a la pregunta y sin apartarnos de la genética, debemos recurrir a conceptos de las ciencias sociales y de la psicología, simplificados y adaptados a la finalidad de este trabajo. Por ejemplo, se menciona desde la revolución industrial en el siglo XVIII, que el avance tecnológico genera incertidumbre en la sociedad. Pero aquí planteamos que no debería generarse incertidumbre en lo que estamos desarrollando dentro del ámbito de I+D+I, campo de

conocimientos objetivos y verificables. Sintéticamente, de la amplia bibliografía del tema, tomaremos algunas citas que la adaptaremos al contexto.

Los especialistas coinciden que *la sociedad moderna está mucho más fragmentada que hace años, en especial por la revolución digital*. Y buscando nuevos paradigmas, el profesor Manuel Castells, en su artículo “La dimensión cultural de internet”, menciona que *el nuevo paradigma tecnológico tiene dos expresiones tecnológicas: una es Internet. La otra es la ingeniería genética*. Relacionado con la ingeniería genética, desde que surgió la misma, distintos sectores de la comunidad nacional e internacional la cuestionaron y asustaron a la población sin evidencias científicas. Esto de asustar a la población viene de lejos en la historia. Ya en el siglo XVIII, el escritor, filósofo y político británico Edmund Burke escribió “El miedo es el más ignorante, el más injusto y el más cruel de los consejeros”.

Quienes están preocupados por el hambre en el mundo y reconocen divergencias extremas en la alimentación de la población mundial, ven con esperanza y sin prejuicios las ventajas de la incorporación de nuevas herramientas para producir más y mejores alimentos. Así es que la Pontificia Academia de las Ciencias desde 2001 y hasta 2009, declararan que *no hay nada intrínseco al uso de la tecnología de ingeniería genética para el mejoramiento vegetal que pueda hacer que las plantas o sus productos alimenticios derivados pierdan su inocuidad*. Es necesario remarcar aquí, que si bien los científicos disponen cada vez de más información, descuidan frecuentemente la visión holística en sus investigaciones por diversas razones, que exceden este trabajo y que tienen que ver con: a) sus propias carreras de investigador o tecnólogo, b) la publicación de artículos en un sistema exigente para difundir trabajos y c) la necesidad de reconocimiento y la vanidad. Como consecuencia, se condicionan las investigaciones y la difusión de resultados. Ese condicionamiento de diversa índole desde la exigencia a publicar hasta la ideología del investigador, del grupo de trabajo o de la revista en donde se publica, se agrava cuando la información no está asociada a ideas, que es una manera de pensar para que las investigaciones adquieran relevancia.

Cada vez más frecuentemente se reemplazan las ideas por el *marketing*, en muchas actividades. De ahí surgió la posverdad que refiere a las informaciones o aseveraciones para modelar la opinión pública que no se basan en hechos objetivos, sino que apelan a las emociones, creencias o deseos

del público. Si bien esa definición y planteo se generó en la política y continuó en otros ámbitos, resulta preocupante que ese fenómeno ya esté presente en la ciencia y en la tecnología. En el contexto tecnológico en general y de la agricultura moderna e intensiva en particular, se observan fenómenos ya estudiados por la sociología: “hay mitos o doctrinas que rechazan las consecuencias de la modernidad surgidas desde la modernidad tecnológica”. Veamos algún ejemplo en la producción de alimentos *básicos* para la población humana más desprotegida. Se ha demostrado, incontrastablemente, que los avances tecnológicos en la producción de alimentos para la población humana, se pueden realizar sin que se afecte la sostenibilidad de los sistemas ni la seguridad alimentaria. Con control, claro. Entonces, volviendo a los mitos o doctrinas deberíamos formular la siguiente pregunta más específica sobre el tema: ¿Por qué se rechazan algunas de las consecuencias de la modernidad y no otras? Para ello, recurriremos a tres situaciones claras en la que el rechazo está directa o indirectamente presente en ciertos trabajos o grupos de trabajos opinando o concluyendo sobre la agricultura moderna e intensiva en particular:

1. Se rechazan los transgénicos en plantas.
2. Se culpa a la revolución verde, al *arroz dorado transgénico*, etc., de ciertos riesgos alimentarios.
3. Se rebautizan como tóxicos compuestos químicos para la agricultura.

Hasta al ADN, que es universal en los seres vivos es transformado en tóxico, distorsionando y afirmando en diferentes trabajos que los transgénicos son tóxicos.

Los puntos mencionados están muy asociados a la FAO, cuyo mandato es que impere la seguridad alimentaria elevando los niveles de nutrición, mejorando la productividad agrícola, las condiciones de la población rural, y contribuyendo a la expansión de la economía mundial. Claramente se rechazan en mayor medida las consecuencias de la modernidad en alimentos y agricultura que en otras disciplinas, si bien los controles de los productos de la ingeniería genética en plantas son tan o más estrictos que en otros *ámbitos* tan sensibles como la salud humana y la contaminación de diversa índole, generada directa o indirectamente por la población humana.

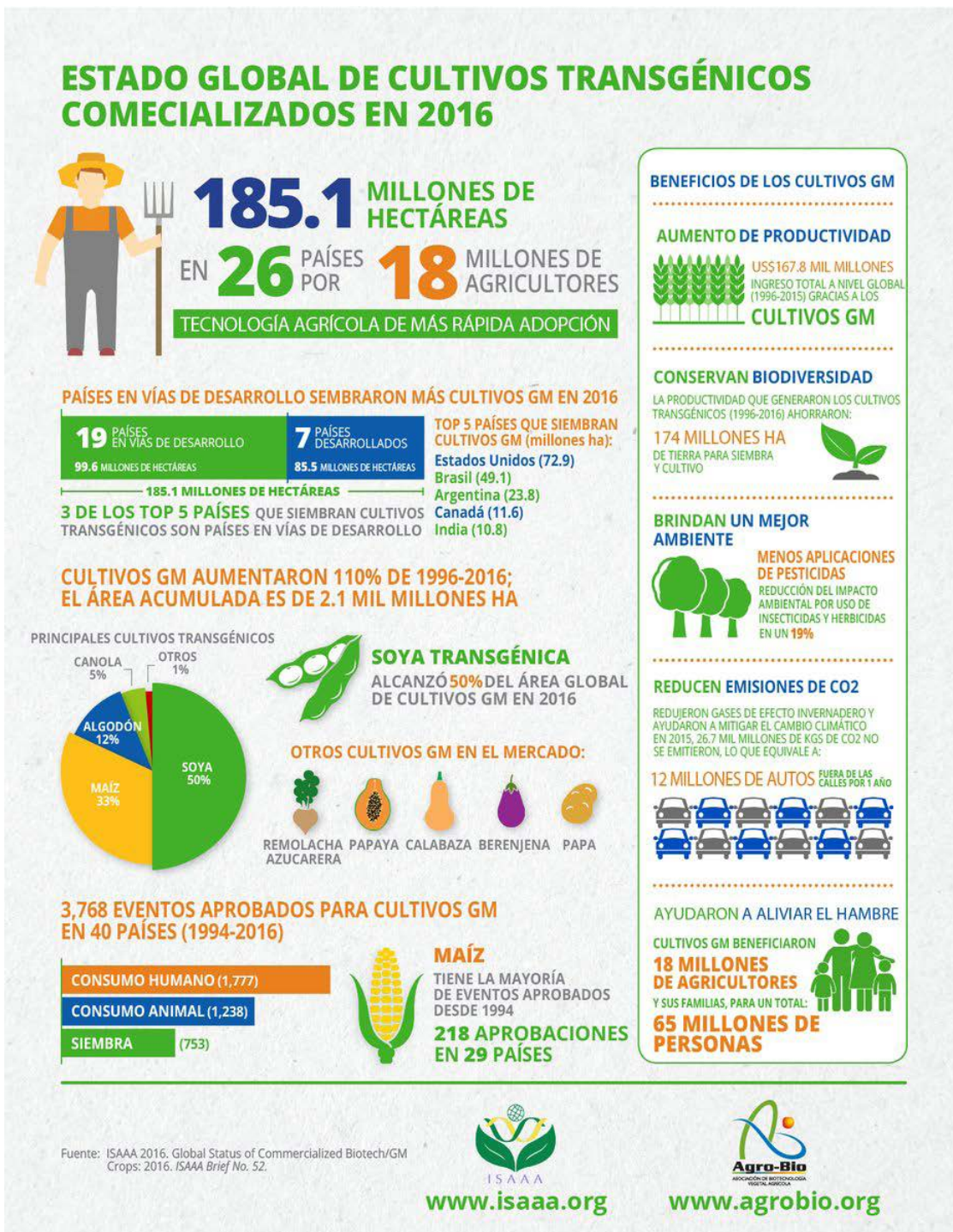
Por ejemplo, en los productos fitosanitarios normalmente utilizados en agricultura en la Argentina, el riesgo es cada vez menor (bien utilizados) para la salud humana. Sin embargo, diversas organizaciones y científicos

valiéndose de la posverdad y del impacto mediático los denominan agrotóxicos sin evidencias concretas. Entre 1985 y 2012 los productos fitosanitarios muy peligrosos (clase I) que eran 25% del total fueron reemplazados y actualmente 90% de ellos son clase IV de muy bajo riesgo toxicológico para el ser humano. No existe otra actividad humana, fuera de la agricultura moderna, en la que en pocas décadas se haya revertido, positivamente, el impacto de la toxicidad como pasó con los productos fitosanitarios.

A lo anterior hay que sumarle que en la agricultura moderna, el mejoramiento vegetal con métodos convencionales complementados y potenciados con modernas herramientas de la ingeniería genética, logra resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades que disminuyen o sustituyen el uso de productos fitosanitarios mejorando el ambiente. Además, se logró el aumento de la productividad por unidad de superficie de alimentos en particular, lo que permite aislar y conservar áreas para la biodiversidad (Figura).

De todo ese avance biotecnológico en el mundo, la Argentina tuvo y tiene un rol importante por al menos dos motivos:

1. Es un país con una larga trayectoria agrícola-ganadera y tiene antecedentes de mejoramiento genético de nivel internacional en cultivos como trigo y maíz, papa y maní, forrajeras y hortícolas, además de algodón, caña de azúcar y yerba mate, para nombrar las especies cultivadas con más trayectoria local, aunque en distinta medida se ha avanzado en la selección de alrededor de 50 especies de cereales y oleaginosas, forrajeras, hortícolas, frutícolas, forestales, florales e industriales.
2. Es el tercer productor de soja después de USA y Brasil, pero es el primer exportador de derivados agroindustriales (66% del total exportado) y de grano de soja (34% del total exportado). En menos de 20 años desde su primera comercialización, casi el 100% de la soja sembrada en la Argentina es transgénica y esos cultivares tienen un gran potencial de rendimiento y adaptación, logrados con el mejoramiento genético local. La Argentina es además, exportador neto de maíz, trigo, girasol, peras, manzanas, limones y derivados (primer productor mundial), entre muchos otros, con una agroindustria que junto al mejoramiento genético y a la agricultura, respetando a la diversidad en las zonas protegidas y a la agrobiodiversidad en zonas agropecuarias, son el camino para alimentar al mundo y proveer energía.



ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops for 2016. ISAAA No. Brief 52. ISAAA, Ithaca, New York, USA, <http://www.isaaa.org>

CONCLUSIONES

Ante ese contexto o conjunto de circunstancias relacionadas con la terminología, su significado, sus alcances y sus consecuencias, que fueron desarrollados en esta entrega y viendo cómo se distorsiona la información referida al tema, tal vez, una buena conclusión esté asociada a los prejuicios sobre cuestiones que no se conocen bien. Esperemos entonces, que la ciencia, hoy en parte cautivada por la posverdad, esté a la altura de las circunstancias y ayude a definir como alimentar a 9.000 millones de personas, con pragmatismo mediante el uso de la tecnología disponible, respetando a la diversidad y conservando los recursos genéticos estratégicos para responder a los retos del futuro.

LECTURAS RECOMENDADAS

Genética, mejoramiento y obtención de cultivares:

Doré C.,Varoquaux F. (coord.) (2006) Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. INRA. Editions Quae. 812 pp.

Gallais A. (1990) Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson,Paris. 588 pp.

Rimieri P. (2013) La estructura genética de poblaciones de plantas condiciona la interpretación de parámetros y su alcance en caracteres ecofisiológicos. BAG. Journal of Basic & Applied Genetics, 24: 5-10. |

Grupo de estudios de sistemas ecológicos en ambientes agrícolas:

<https://sites.google.com/site/geseaaegeuba/home>

Biotecnología:

<http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=399>

<http://argenbio.org/index.php?action=biblioteca&opt=8>

<https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/>

<http://www.isaaa.org>

<http://www.agrobio.org>

La dimensión cultural de internet:

<http://www.uoc.edu/culturaxxi/esp/articles/castells0502/castells0502.html>

Agricultura y buenas prácticas:

<http://www.casafe.org>

HEP-2 CELL LINE AS AN EXPERIMENTAL MODEL TO EVALUATE GENOTOXIC EFFECTS OF PENTAVALENT INORGANIC ARSENIC

HEP-2 COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DEL ARSÉNICO INORGÁNICO PENTAVALENTE

Andrioli N.B.^{1,*,‡}, Chaufan G.^{2,‡}, Coalova I.², Ríos de Molina M.C.², Mudry M.D.¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), CONICET- Universidad de Buenos Aires, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEB), Buenos Aires, Argentina.

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (LEEM), CONICET- Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), Buenos Aires, Argentina.

* Corresponding author: nancyandrioli@gmail.com / ‡ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Early detection of toxic events induced by xenobiotics is necessary for a proper assessment of human risk after the exposure to those agents. The aim of this work was to evaluate the cell line HEP-2 as an experimental model to determine the genotoxic effects of sodium arsenate. To this end, we determined the metabolic activity cells by the MTT test on seven concentrations of arsenate that range from 27 to 135,000 μM , obtaining the median lethal concentration (LC_{50}), the lowest observed effect concentration (LOEC), and the not observed effect concentration (NOEC) of sodium arsenate at 24 h of exposition. According to the cytotoxic response obtained, we evaluated the genotoxic effect of the 27 and 270 μM concentrations by using the micronucleus assay and chromosomal aberrations test. We found a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of micronuclei between control cultures and those exposed to the highest concentration of sodium arsenate. Furthermore, the frequencies of nucleoplasmic bridges and tripolar mitosis were significantly higher in cell cultures exposed to the above concentrations compared to the control cultures ($p < 0.05$). The participation of the glutathione system as response to the arsenate exposition was also analyzed, and a statistically significant increase in the glutathione content was found in those cells exposed to 27 μM of arsenate. The Glutathione S-transferase activity did not increase in the exposed cells compared to control cells, suggesting that the arsenate reduction involved other metabolic pathways in the HEP-2 cells. These results confirm that, under the conditions carried out in this study, sodium arsenate is genotoxic for HEP-2 cells. Therefore, we suggest that this cell line would be a good model for the assessment of the cytotoxic and genotoxic effects of xenobiotics on human cells.

Key words: cytotoxicity, genotoxicity, Glutathione, HEP-2 cell line

RESUMEN

La detección temprana de eventos tóxicos inducidos por xenobióticos es necesaria para una adecuada evaluación del riesgo humano ante la exposición a dichos agentes. El objetivo de este trabajo fue evaluar a la línea celular HEP-2 como modelo experimental para determinar los efectos genotóxicos del arseniato de sodio. Para ello, se determinó la actividad metabólica de las células mediante el ensayo de MTT, en siete concentraciones de arseniato de sodio en el rango 27-135.000 μM , determinando la concentración letal media (LC_{50}), la menor concentración de efecto observado (LOEC) y la mayor concentración de efecto no observado (NOEC) de arseniato de sodio para una exposición de 24 h. Teniendo en cuenta los datos de citotoxicidad, se evaluó el efecto genotóxico a las concentraciones 27 y 270 μM por medio del ensayo de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, encontrando un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos entre el control y la mayor concentración arseniato de sodio ensayada. Además, la presencia de puentes nucleoplasmáticos y mitosis tripolar fue significativamente mayor en ambas concentraciones estudiadas con respecto al control. Se analizó la participación del sistema de glutatión como respuesta a la exposición al arseniato, encontrándose un aumento estadísticamente significativo en el contenido de glutatión en la concentración de arseniato de 27 μM . La actividad de la glutatión S-transferasa no aumentó, lo que sugiere que la reducción del arseniato implicó otra vía metabólica en las células HEP-2. Estos resultados confirman que el arseniato de sodio induce genotoxicidad en células HEP-2 en las condiciones realizadas en este estudio y por lo tanto este tipo de línea celular es un buen modelo para ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad en los cuales se quiere evaluar el riesgo humano.

Palabras clave: Citotoxicidad, Genotoxicidad, Glutatión, HEP - 2.

INTRODUCTION

The genotoxic response of the biological system after the exposition to chemical agents depends on the capacity of metabolization, metabolic rate, repair enzymes activity and antioxidant response (Westerink *et al.*, 2001; Wilkening *et al.*, 2003; Raisuddin and Jha, 2004). Historically, researchers have employed different experimental designs, analytical techniques and biological models to study the genotoxic potential of certain compounds. Primary cultures or established cell lines of vertebrates are now commonly used to analyze the genotoxicity potential of drugs and complex mixtures. The use of *in vitro* models is promising because it reduces the use of experimental animals. An additional advantage of these models is that multiple tests can be performed with a relatively small amount of sample. The human epidermoid laryngeal carcinoma (HEp-2) cell line would be an ideal model for cytotoxic and genotoxic tests, due to its availability, stable phenotype, unlimited life-span, and the fact that it is easy to handle (Coalova *et al.*, 2014). Few data exist on the use of HEp-2 cells to evaluate the genotoxicity of chemical agents, despite the fact that some studies were conducted with this cell line to evaluate the genotoxic effects of natural products and nanoparticles (Rizo *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2005; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2006; Goma *et al.*, 2015; Ahamed *et al.*, 2015; Dos Santos Branco *et al.*, 2015). Moreover, it is well-known that glutathione and glutathione-S transferases are involved in the metabolism of HEp-2 cells (Summer and Wiebel, 1981).

Among the agents studied in toxicology are the arsenical compounds, especially the inorganic arsenic species (iAs), which are frequently found as environmental contaminant. These chemical species may be either of geogenic and/or anthropogenic origin. Arsenic is a by-product of the copper, lead, zinc, tin and gold industry, as it is found as an impurity of many of these metals (Albiano and Villaamil Lepori, 2015). It is a metalloid that in contact with the humid air easily oxidizes to arsenic trioxide (arsenious anhydride) and, in contact with water, generates arsenate disodium. This toxic pentavalent is reduced to the trivalent form, and then to the organic forms that, in animals, will be excreted by urine. Acute intoxication causes, in the short term, respiratory tract irritation, and chronic intoxication produces multiparenchymal effects, involving the trachea and lung among other organs (Albiano and Villaamil Lepori 2015).

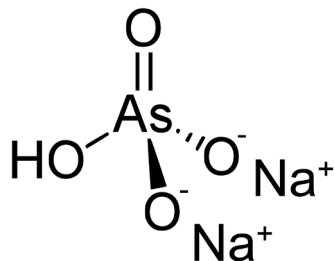
The cytotoxic and genotoxic effects of iAs, predominantly of the trivalent form (iAs^{III}), were widely reported, both in human epidemiology studies and *in vitro* and *in vivo* assays. These studies are based on the analysis of several end points analysis, such as micronuclei (MN), sister chromatid exchange (SCE), numerical and structural chromosome aberrations (CA), arrest of mitosis and apoptosis (Schuhmacher-Wolz *et al.*, 2009; Basu *et al.*, 2004; Yadav and Trivedi, 2009; Ahmed *et al.*, 2011). Epidemiologic studies indicate that the human intake of iAs produces many effects including cancer (IARC, 2004; Environmental Protection Agency, 2001; European Chemicals Bureau, 2007). Some studies have revealed tumor development in mice (Tokar *et al.*, 2010; Tokar *et al.*, 2011; Waalkes *et al.*, 2007) although different studies in animals models have given doubtful results (Huff *et al.*, 2000; Schuhmacher-Wolz *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2011).

Since there are evidences that iAs are not mutagenic in bacteria or mammalian cells (Rossman *et al.*, 1980; Gebel, 2001), the genotoxicity could involve different mechanisms, such as the biomethylation of iAs (with subsequent hypomethylation of DNA), changes in the expression of genes of cell cycle control, DNA repair genes and oxidative stress due to the interaction with the glutathione system involved in the metabolization process (Kitchin, 2001; Miller *et al.*, 2002; Rossman and Klein, 2011; Thompson, 1993).

Sodium arsenate, the pentavalent inorganic arsenic (iAs^V), is used as biocide in plague control and as a preservative of various industrial products (Figure 1A). It is the most predominant species of inorganic arsenic in the surface water, being a potential source of environmental contamination and human exposition. It is known that sodium arsenite (iAs^{III}) is more toxic than iAs^V, presumably because the cellular uptake of iAs^V is difficult due to their electric charge and competition with the cellular phosphate (Nakamuro and Sayato, 1987; Kochhar *et al.*, 1996). In mammals, including humans, the iAs^V is partly reduced into the cells to As^{III} non-enzymatically by glutathione oxidation or enzymatically catalyzed by reductases and then methylated, forming monomethylated arsenicals (MMA) and dimethylated arsenicals (DMA) (Figure 1B). Differences in the reduction and methylation rates were found in biological models (Odanaka *et al.*, 1980; Vahter, 2002). For example, a study showed that the rate of metabolic reduction of iAs^V was lower in HeLa cells than in HepG2 cells (Peel *et al.*, 1991). Therefore, the iAs^V in HEp-2

cells could be reduced to iAs^{III} , by metabolic bioactivation involving the GSH/GST system, increasing thereby their genotoxic potential (Carmichael *et al.*, 1988). Considering the data registered for cytotoxicity and genotoxicity of iAs in other models and experimental designs, the aim of the present work was to apply short-term assays to analyze the HEP-2 cell line as an experimental model to determine the genotoxic effects of sodium arsenate (Na_2HAsO_4), the less toxic form of inorganic arsenic, in human cells.

A.



B.



Figure 1. Geometry of sodium arsenate formula (A), and reduction and methylation of As^V (B). Enzymes: PNP, purine nucleoside phosphorylase; AMT, arsenic methyltransferase; GST, GSH S-transferase. iAs : MMA^V , pentavalent monomethylarsonic acid; MMA^{III} , trivalent monomethylarsonic acid; DMA^V , pentavalent dimethylarsonic acid; and DMA^{III} , trivalente dimethylarsonic acid.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Modified Eagle's medium (MEM), MEM vitamin solution, MEM non-essential amino acid solution, and 0.05% trypsin-EDTA, were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from BIO-NOS (Buenos Aires, Argentina). The 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (CAS N° 97-00-7), 3 - (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (CAS N° 298-93-1), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (CAS N° 28718-90-3), 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (CAS N° 69-78-3), cytochalasin B (CAS N°

14930-96-2), glutathione (CAS N° 70-18-8), and sodium arsenate dibasic heptahydrate (CAS N° 10048-95-0) were purchased from Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). Giemsa (CAS N° 51811-82-6) was purchased from Biopur S.R.L. (Riccheri 195 Rosario, Argentina).

Cell culture

The human cell line HEP-2 was obtained from the ABAC (*Asociación Banco Argentino de Células*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) and it was cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2.5 μ g/ml amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. Cell culture medium was renewed twice a week. After 7 days, cells became confluent and ready to use. For all experiments, confluent attached cells were removed from cell culture dishes with 0.25% sterile trypsin and diluted with MEM/10% FBS. For MTT assay cells were reincubated into 96-well plates (0.2 ml; 2×10^4 cells/well), cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was performed into 6-well plates (2 ml; 3.8×10^5 cells/well), whereas GST activity and GSH content assays were performing reincubating the cells into Petri dishes (8 ml; 7.5×10^6 cell/plates).

MTT assay

To determine the range of concentrations of arsenate that keep the metabolic activity of cells, we exposed cell cultures to concentrations of iAs^V ranging from 27 to 27,000 μ M. We used the method of Mossman (1983), with minor modifications. Briefly, cells were exposed for 24 h in serum-free medium to different dilutions of iAs^V . Following incubation, treatment cell culture medium was removed; cells were washed with PBS and replaced with 1 mg/ml of sterilized MTT solution. This MTT solution was freshly prepared in MEM containing no FBS, since it has been shown that FBS can dose-dependently inhibit formazan crystals formation, with a 50% decrease in these crystals when media with 5-10% FBS is used (Talorete, 2007). The plates with added MTT solution were then placed in the 5% CO_2 incubator for 90 min at 37°C. MTT solution was removed and 200 μ l of ethanol was added to each well to dissolve the blue formazan crystals. Optical density was measured at 570 nm with background subtraction at 655 nm, in a BIO-RAD Benchmark microplate reader (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA). Results were

expressed as percentage of control (100% cell metabolic activity). Each assay involved 12 wells per condition and was performed in triplicate.

Glutathione-S-transferase activity (GST) and Glutathione Equivalents Content (GSH)

For the determination of GST activity and GSH content, cells were grown at confluence in Petri dishes, washed twice with PBS, and then treated with 27 and 270 μM iAs^{V} for 24 h. Then, cells were harvested, sonicated, and determinations were carried out in 11,000 \times g supernatants.

Glutathione-S-transferase (EC 1.11.1.9) activity was measured by the Habig technique (Habig *et al.*, 1976). Briefly, standard assay mixture contained the enzymatic sample, 100 mM GSH, and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in ethanol, in 100 mM phosphate buffer (pH 6.5), to a final volume of 0.8 mL. After adding CDNB, the change in absorbance at 340 nm was followed for 120 s. One GST unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 mmol of GS-DNB per minute at 25°C. Results were expressed as percentage of control.

Glutathione levels were measured following the method of Anderson (1985), with modifications. Briefly, 100 μL supernatant from the 11,000 \times g sample was acidified with 50 μL of 10% sulfosalicylic acid. After centrifugation at 8,000 \times g for 10 min, supernatant (containing acid-soluble GSH) aliquots were mixed with 6 mM 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) in 0.143 M buffer sodium phosphate (pH 7.5), (containing 6.3 mM EDTA). Absorbance at 412 nm was measured after 30 min incubation at room temperature. GSH content was determined by standard curve generated with a known GSH amount as reference. Results were expressed as nmol thiols (GSH equivalents) per mg proteins and presented as percentage of control.

Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

According to the results obtained on metabolic activity for MTT test, the CBMN assay was performed by exposing cells at 27 and 270 μM of iAs^{V} . Following the method of Fenech (2007), the cells were sub-cultured on glass coverslips in 6-well plates. Twenty four hours after seeding, the medium was removed and cells were treated with iAs^{V} at 27 and 270 μM in serum-free medium for 24 h. Then, cells were washed with PBS and incubated with medium containing cytochalasin B (final concentration 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

for 18 h. After these treatments, cells were washed with PBS and fixed with glacial acetic acid: methanol (1:3 v/v) for 10 min at room temperature. Then cells were washed twice with PBS, stained with Giemsa (10% p/v), washed again with PBS and after that, the slides were mounted.

Scoring of slides and data analysis

The slides were examined under a Leica DMLB light microscope (1000 \times). One thousand cells from the negative control and treated groups were examined to calculate the binucleate cells frequency (BN), the micronuclei frequency (MNI), and the nuclear division index (NDI). The chromosome aberrations frequency (CA) as abnormal division were quantified at the same time that the MNI.

$$\% \text{ MNI} = (\text{N}^{\circ} \text{ of BN cells whit MNI} / 1000 \text{ BN cells}) \times 100$$

$$\text{NDI} = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N, \text{ where } M_1\text{--}M_4 \text{ represent the number of cells with 1--4 nuclei and } N \text{ is the total number of cells scored.}$$

$$\% \text{ CA} = (\text{N}^{\circ} \text{ of chromosomal aberration} / 1000 \text{ cells}) \times 100$$

Statistical analysis

Each experiment was performed three times in different weeks. Statistical analysis were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test using significant levels of $p < 0.05$. Normality and homogeneity of variances were tested with the Lilliefors and Barlett tests, respectively. The LC_{50} value was estimated by nonlinear regression sigmoidal dose-response method. Graph Pad Prism 4 software was used for all statistical analysis.

RESULTS

Metabolic activity cells

The HEP-2 cell line was assayed using MTT assay to examine the effect of 27 to 135,000 μM iAs^{V} (27; 270; 27,000; 54,000; 64,500; 80,600; 121,000; and 135,000 μM). The corresponding LC_{50} , LOEC (lowest observed effect concentration), and NOEC (no observed effect concentration) were determined at 24 h (Table 1 and Figure 2).

Glutathione content and glutathione S-transferase activity

The glutathione system could participate in the bioactivation enzymatic or non-enzymatic of As^{V} by

Table 1. Toxicity values for HEp-2 cell line exposed to sodium arsenate for 24 h.

Sodium Arsenate Na_2HAsO_4	LC_{50} (μM)	LOEC (μM)	NOEC (μM)
	1575.3 (1034.4 - 2399)	268,8	---

LC_{50} : median lethal concentration. LOEC; lowest observed effect concentration. NOEC; not observed effect concentrations, statistically determined. LC_{50} was estimated by nonlinear regression sigmoidal dose-response (variable slope) method. Graph Pad Prism 6 software was used for all statistical analyses. LC_{50} , LOEC, and NOEC were presented as mean of three independent analyses.

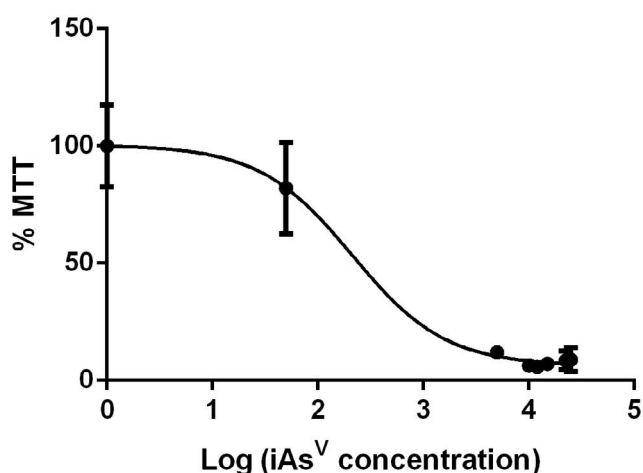


Figure 2. Dose-response curve for iAs^{V} effects fitted by non-linear regression. These effects were evaluated by the MTT test. Data are expressed as mean + SD ($n = 8$), relative to control cells (100% viability). MTT, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SD, standard deviation.

reduction to As^{III} . The results showed a statistically significant increase in GSH content in cells exposed to $27 \mu\text{M}$ iAs^{V} and a statistically significant decrease at $270 \mu\text{M}$ iAs^{V} , compared to the control ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Figure 3A). GST activity did not show statistically significant differences (Figure 3B).

CBMN assay in the HEp-2 cell line

The CBMN assay was performed in the HEp-2 cell line to evaluate genotoxicity. Taking into account that the maximum concentration assayed for the genotoxicity test should not induce more than 50% of the cellular toxicity found with the MTT assay, the concentrations of iAs^{V} selected for CBMN were 27 and $270 \mu\text{M}$. The

NDI (Figure 4A), which ranges from 1.0 (cells have failed to divide) to 2.0 (all cells have divided once), was similar for the two concentrations tested, with no significant differences between the control (1.27), $27 \mu\text{M}$ (1.35) and $270 \mu\text{M}$ (1.15). A significant difference was found in the frequency of micronuclei, between control and $270 \mu\text{M}$ iAs^{V} ($p < 0.05$) (Figure 4B and Figure 5A). The occurrence of nucleoplasmic bridges and tripolar mitosis were significantly higher in both concentrations respect to the control (Figure 4C and 4D; Figure 5B, 5C and 5D).

DISCUSSION

The iAs^{V} is present in nature, and its origin can be either geogenic or anthropogenic, in the latter as a result of industrial wastes. Moreover, iAs^{V} is the most predominant species of inorganic arsenic in the surface water, where the oxygen level is high enough to avoid the reduction to iAs^{III} . The reduction of iAs^{V} to iAs^{III} within the cell could involve the participation of GSH and GST, both of which are present in HEp-2 cells (Summer and Wiebel, 1981). However, our results showed an increase of the GSH level without increasing GST activity by exposing cells to different concentrations of iAs^{V} . These data indicate that GST is not involved in metabolism of iAs^{V} , and that the increase of GSH due to iAs^{V} exposition could be attributed to non-enzymatic reduction to iAs^{III} . Moreover, the GSH increase found in HEp-2 cells treated with iAs^{V} could be related to an induction of Γ -glutamylcysteine synthetase—the enzyme that controls the biosynthesis of GSH—due to the redox imbalance produced by iAs^{V} . Furthermore, GSH content decreased below control levels at higher concentrations of arsenic as a result of GSH consumption by reduction iAs^{V} to iAs^{III} .

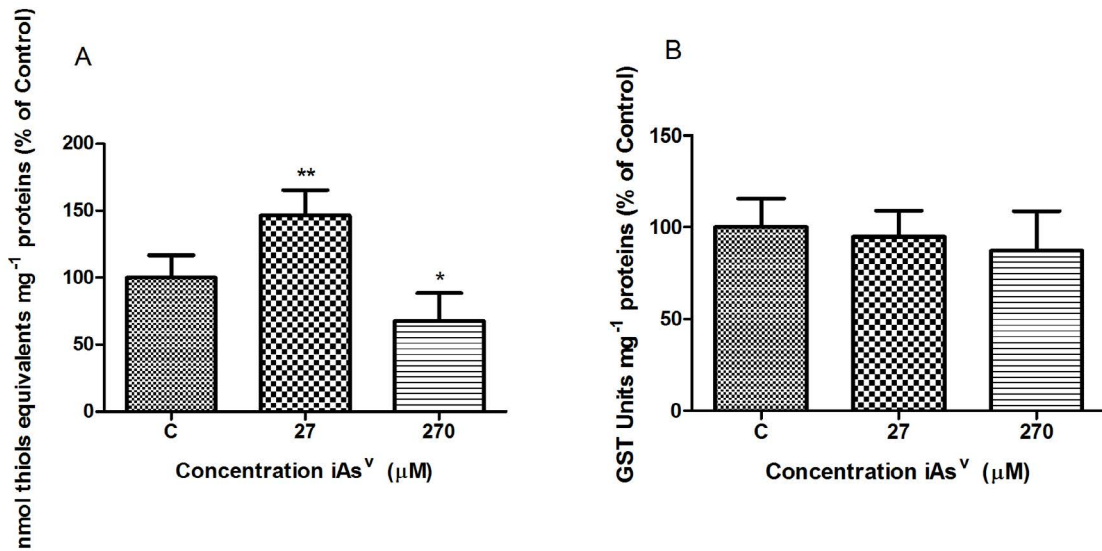


Figure 3. Glutathione Equivalents Content (A) and Glutathione-S-transferase activity (B). HEp-2 cells were exposed to iAs^V at different concentrations (27, and 270 μM) for 24 h. Results are reported as mean ± S.D. Significant differences between treatments and control are indicated by * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

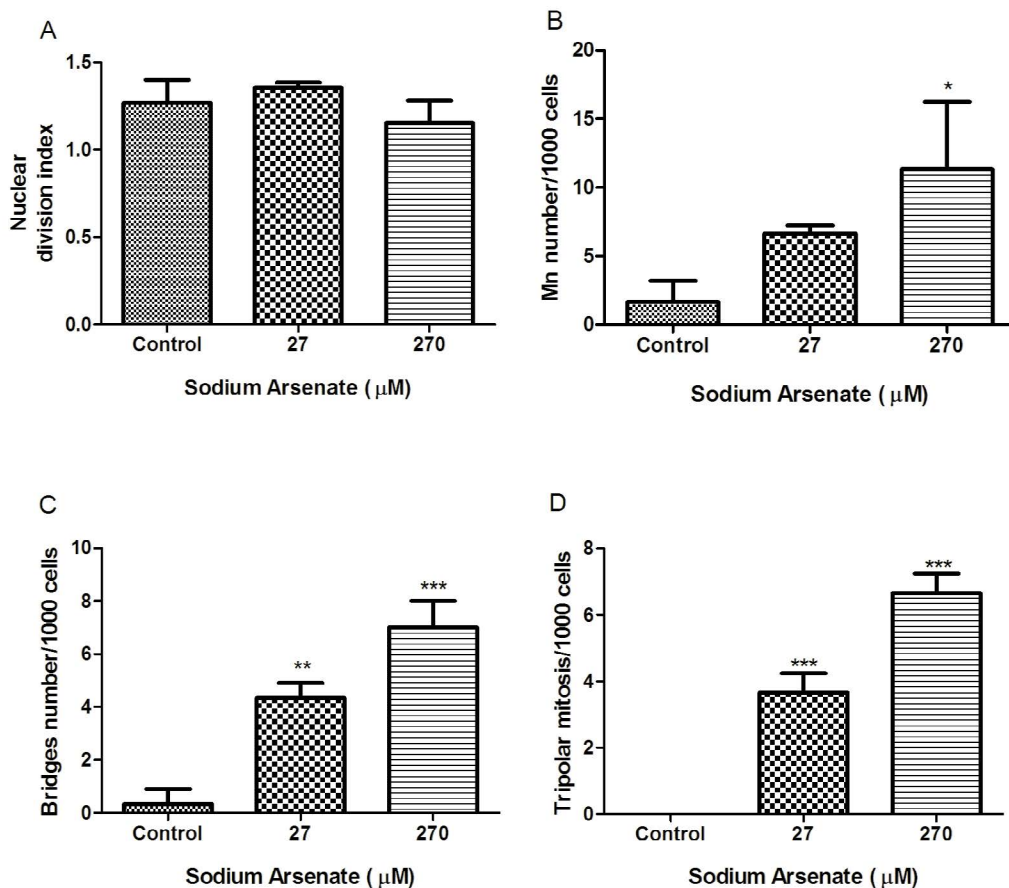


Figure 4. CBMN assay performed in HEp-2 cell line showing (A) nuclear division index, (B) number of micronuclei per 1,000 binucleated cells, (C) number of tripolar mitosis per 1,000 binucleated cells, and (D) number of nucleoplasmic bridges per 1,000 binucleated cells. Results were expressed as mean ± SD (n = 3). Significant differences between treatments and control are indicated by * (** $p < 0.001$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.05$).

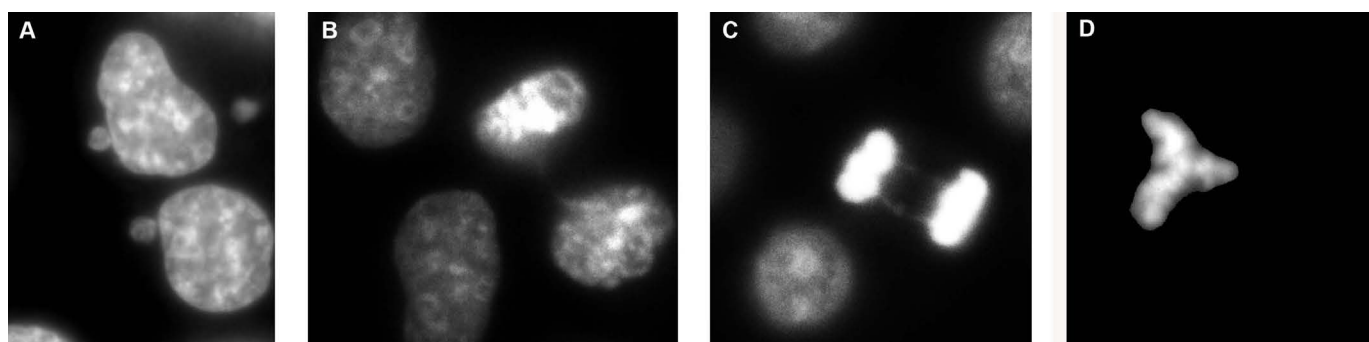


Figure 5. Nuclear morphology analysis of HEP-2 cell line. CBMN assay, an established biomarker for genomic instability, to evaluate susceptibility of HEP-2 cell line by measuring sodium arsenate-induced chromosomal damage endpoints (A, micronuclei; B,C nucleoplasmic bridges; and D, tripolar mitosis). Nuclear DNA was stained with DAPI dye and visualized by fluorescence microscopy using filters for DAPI (λ_{exc} : 330-380 nm; λ_{em} : 435-485 nm).

The literature about the mutagenicity of iAs^{III} and iAs^V indicates that DNA is not the target of these chemical species (Gebel, 2001). In addition, an indirect genotoxic effect of iAs^{III} and iAs^V is involved due to their interaction with different molecules such as repair enzymes, cell cycle control proteins, apoptosis related gene products, nuclear lamins, defense cellular system against oxidative damage (GSH), metabolism enzymes, and tubulines of the mitotic spindle (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Studies on iAs^V genotoxicity show that at 24 h of exposition, iAs^V 1 μM is the lowest dose that induce MNi in CHO cells, whereas 16 μM and 10 μM were the lowest concentration of iAs^V that induced chromosomal aberrations in human umbilical cord fibroblasts and in human peripheral lymphocytes, respectively (Doppet *et al.*, 2004; Florea *et al.*, 2005; Kligerman *et al.*, 2003; Oya-Ohta *et al.*, 1996).

The two concentrations of iAs^V tested in this study (27 and 270 μM) induced chromosomal abnormalities and MNi at 24 h after treatment, although only the highest concentration induced a significant statistically increase of MNi in HEP-2 cells. To analyze the genotoxicity of a chemical agent, the cytotoxicity should be very low or null for the concentrations tested (Gebel, 2001). Conservation of cell proliferation is necessary to manifest genotoxicity through MNi formation, since the MNi are formed during cellular division. In the present study concentrations inducing MNi do not affect cell proliferation in HEP-2 as indicated by the MNi formed by chromatin fragments or whole chromosomes, when the spindle attachment

fails. Whereas the spindle failure was attributed to iAs^{III} exposition (Sciandrello *et al.*, 2002), the tripolar spindles would indicate its effects on microtubules and microtubule associated proteins (MAPs). This is in accordance with other studies (Liao *et al.*, 2007) and with the mechanism proposed by several authors to explain the toxicity of iAs^V , such as the depletion of ATP formation by replacement of phosphate during oxidative phosphorylation (Gebel, 2001). The genotoxic agents which exert their mode of action without binding to DNA show a threshold and a sublinear concentration-effect relationship (Elhajouji *et al.*, 1997). However, it is still unclear if the genotoxicity of iAs is characterized by this mode of action (Rudel *et al.*, 1996; Raja *et al.*, 2013). This is an interesting subject that could be included in future studies. There is currently a need for rapid and efficient delivery of results in *in vitro* systems that are actually predictive of the *in vivo* situation. This requires a versatile system in daily use, which shortens experimentation times. At the same time, the use of *in vitro* models reduces the number of animal experiments needed to address genotoxicity studies. According to our results, the biological model of HEP-2 cells seems to satisfy these criteria. In conclusion, under the conditions carried out in this study, the HEP-2 cell line allowed us to detect the cytotoxic and genotoxic effects of iAs^V . In addition, this model could be an alternative in a battery of assays of genotoxicity for the evaluation of human risk after the exposition to chemical substances, either of natural origin or associated with occupational risks.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahamed M., Alhadlaq H.A., Ahmad J., Siddiqui M.A., Khan S.T., Musarrat J., Al- Khedhairi A.A. (2015) Comparative cytotoxicity of dolomite nanoparticles in human larynx HEp2 and liver HepG2 cells. *J. App. Toxicol.* 35(6): 640-650.
- Ahmed S., Khoda S.M.E., Rekha R.S., Gardner R.M., Ameer S.S., Moore S., Raqib R. (2011) Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ. Health Persp.* 119(2): 258-264.
- Albiano N. E., Villamil Lepori, E. (2015). *Toxicologia Laboral: Criterios para el monitoreo de la salud de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas/ Ampliada*. Buenos Aires: Superintendencia de riesgos del trabajo, 522.
- Anderson M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-553.
- Andrighetti-Fröhner C.R., Kratz J.M., Antonio R.V., Creczynski-Pasa T.B., Barardi C.R., Simões C.M. (2006) In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutat. Res.* 603(1): 97-103.
- Basu A., Ghosh P., Das J.K., Banerjee A., Ray K., Giri A.K. (2004) Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(5): 820-827.
- Carmichael J., Mitchell J.B., Frietman N., Gaznard A.F., Russo A. (1988) Glutathion and related enzyme activity in human lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 58 (4): 437-440.
- Coalova I., Ríos de Molina M.C., Chaufan G. (2014) Influence of the spray adjuvant on the toxicity effects of a glyphosate formulation. *Toxicol. In Vitro* 28(7):1306-1311.
- Dopp E., Hartmann L.M., Florea A.M., Von Recklinghausen U., Pieper R., Shokouhi B., Obe G. (2004) Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Appl. Pharm.* 201(2): 156-165.
- Dos Santos Branco C., de Lima E.D., Rodrigues T.S., Scheffel T.B., Scola G., Laurino C.C.F.C., Salvador M. (2015) Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEp-2 cancer cells. *Chem-Biol. Interact.* 231: 108-118.
- Elhajouji A., Tibaldi F., Kirsch-Volders M. (1997) Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12(3): 133-140.
- Environmental Protection Agency (2001) National primary drinking water regulations, arsenic and clarifications to compliance and new source contaminants monitoring, final rule, Federal Register, 66: 6976-7066.
- European Chemicals Bureau (2007) European chemical substances information system (ESIS).
- Fenech M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Prot.* 2(5): 1084-1104.
- Florea A.M., Yamoah E.N., Dopp E. (2005) Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction. *Environ. Health Persp.* 113(6): 659-664.
- Gebel T.W. (2001) Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203(3): 249-262.
- Gomaa I.E., Bhatt S., Liehr T., Bakr M., El-Tayeb T.A. (2015) Ag and Co/Ag nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity study on hep-2 and blood lymphocytes cells. *Chemical Technology: Key Developments in*

- Applied Chemistry. Biochemistry and Materials Science 13.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1976) Glutathione S-transferase a from rat liver. Arch.Biochem.Biophys. 175(2): 710-716.
- Huff J., Chan P., Nyska A. (2000) Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals? Toxicol. Sci. 55(1): 17-23.
- Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., Thomas D.J. (2011) Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. Toxicol. Sci. 123(2): 305-332.
- IARC (2004) Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 84: 1-477.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicol. Lett. 140: 63-74.
- Kitchin K.T. (2001) Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 172(3): 249-261.
- Kligerman A.D., Doerr C.L., Tennant A.H., Harrington Brock K., Allen J.W., Winkfield E., Mass M.J. (2003) Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. Environ. Mol. Mutagen. 42(3): 192-205.
- Kochhar T.S., Howard W., Hoffman S., Brammer-Carleton L. (1996) Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. Toxicol. Lett. 84(1): 37-42.
- Liao W.T., Lin P., Cheng T.S., Yu H.S., Chang L.W. (2007) Arsenic promotes centrosome abnormalities and cell colony formation in p53 compromised human lung cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 225(2): 162-170.
- Miller W.H., Schipper H.M., Lee J.S., Singer J., Waxman S. (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res. 62(14): 3893-3903.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63.
- Nakamuro K., Sayato Y. (1987) Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. Mutat. Res. 88(1): 3-80.
- Odanaka Y., Matano O., Goto S. (1980) Biomethylation of inorganic arsenic by the rat and some laboratory animals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24(1): 452-459.
- Osman I.F., Baumgartner A., Cemeli E., Fletcher J.N., Anderson D. (2005) Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. Nanomedicine 8: 1193-1203.
- Oya-Ohta Y., Kaise T., Ochi T. (1996) Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. Mutat. Res. 357(1-2): 123-129.
- Peel A.E., Brice A., Marzin D., Erb F. (1991) Cellular uptake and biotransformation of arsenic V in transformed human cell Lines HeLa S 3 and Hep G 2. Toxicol. in vitro 5(2): 165-168.
- Raisuddin S., Jha A.N. (2004) Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single cell gel electrophoresis and cytokinesis block micronucleus assay. Environ. Mol. Mutagen. 44(1): 83-89.
- Raja W.K., Satti J., Liu G., Castracane J. (2013) Dose response of MTLn3 cells to serial dilutions of arsenic trioxide and ionizing radiation. Dose-Response 11(1).
- Rizo W.F., Ferreira L.E., Colnaghi V., Martins J.S., Franchi L.P., Takahashi C.S., Fachin A.L. (2013) Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontanacatharinensis* A. DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). Genet. Mol. Biol. 36 (1): 105-110.
- Rossmann T.G., Klein C.B. (2011) Genetic and epigenetic

- effects of environmental arsenicals. *Metallomics* 3(11): 1135-1141.
- Rossman T.G., Stone D., Molina M., Troll W. (1980) Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ.Mutagen.* 2(3): 371-379.
- Rudel R., Slayton T.M., Beck B.D. (1996) Implications of arsenic genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. *Regul.Toxicol. Pharm.* 23(2): 87-105.
- Schuhmacher-Wolz U., Dieter H.H., Klein D., Schneider K. (2009) Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Crit. Rev.Toxicol.* 39(4): 271-298.
- Sciandrello G., Barbaro R., Caradonna F, Barbata G. (2002) Early induction of genetic instability and apoptosis by arsenic in cultured Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 17(2): 99-103.
- Summer K.H., Wiebel F.J. (1981) Glutathione and glutathione S-transferase activities of mammalian cells in culture. *Toxicol.Lett.* 9(4): 409-413.
- Talorete T.P.N., Bouaziz M., Sayadi S., Isoda H. (2007) Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology* 52: 189-198.
- Thompson D.J. (1993) A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chemi-Biol. Interact.* 88(2): 89-114.
- Tokar E.J., Benbrahim-Tallaa L., Ward J.M., Lunn R., Sans R.L., Waalkes M.P. (2010) Cancer in experimental animals exposed to arsenic and arsenic compounds. *Crit. Rev.Toxicol.* 40: 912-927.
- Tokar E.J., Diwan B.A., Ward J.M., Delker D.A., Waalkes M.P. (2011) Carcinogenic effect of 'whole-life' exposure to inorganic arsenic in CD 1 mice. *Toxicol. Sci.* 119: 73-83.
- Vahter M. (2002) Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181: 211-217.
- Waalkes M.P., Liu J., Diwan B.A. (2007) Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 271-280.
- Westerink W.M., Schirris T.J., Horbach G.J., Schoonen W.G. (2001) Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. *Mutat. Res.* 724(1-2): 7-21.
- Wilkening S., Stahl F, Bade A. (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab.Dispos.* 31(8): 1035-1042.
- Yadav K.K., Trivedi S.P. (2009) Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctate*. *Chemosphere* 77(11): 1495-1500.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from CONICET-Argentina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, PIP 11220090100492) and from Universidad de Buenos Aires, Argentina (UBACyT 01/W985, UBACyT 20020120200176BA, and MDM-UBACyT X154).

UN MÉTODO MOLECULAR RÁPIDO, NO INVASIVO Y SIMPLE PARA DETERMINAR EL SEXO EN PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS

A RAPID, NON INVASIVE AND SIMPLE MOLECULAR METHOD FOR SEX DETERMINATION IN PYGOSCELIS PENGUINS

Santos M.R.^{1*}, Santos M.M.^{2,3}, Terán E.M.¹, Bailliet G.¹, Juárez M.A.^{2,3}

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, Calle 526 y Camino General Belgrano, B1900BTE, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

²Departamento Biología de Predadores Tope, Instituto Antártico Argentino, 25 de Mayo 1143, B1650 CSP, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

³Laboratorios Anexos, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Autor correspondiente: mritasantos@yahoo.com.ar

ABSTRACT

In Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) and gentoo penguins (*Pygoscelis papua*), the conspicuous sexual dimorphism often makes it difficult to determine sex on the basis of external morphology. The information about sex is important in many ecology and conservation studies. In this paper we evaluated the use of an established primer pair (2550F/2718R) to identify sex in sexually monomorphic birds. In both penguin species, it resulted in two distinct *CHD1Z* and *CHD1W* PCR bands, allowing sex identification. This is a simple, rapid and cheap system for molecular sexing of gentoo and Adélie penguins.

Key words: *CHD* gene, sex identification, penguins

RESUMEN

En los pingüinos Adélie (*Pygoscelis adeliae*) y pingüinos gentoo (*Pygoscelis papua*), no existe un dimorfismo sexual conspicuo y a menudo resulta difícil determinar el sexo en base a la morfología externa. La información sobre el sexo es importante en muchos estudios de ecología y conservación. En este artículo se evaluó el uso de un par de cebadores (2550F/2718R) para identificar el sexo en aves sexualmente monomórficas. Para ambas especies de pingüinos la amplificación produjo dos bandas discretas, *CHD1Z* y *CHD1W*, que permitieron la identificación sexual. Se trata de un sistema sencillo, rápido y económico para el sexaje molecular de los pingüinos gentoo y Adélie.

Palabras clave: gen *CHD*, sexado molecular, pingüinos

Fecha de recepción: 11/04/2017
Fecha de aceptación de versión final: 21/07/2017

INTRODUCCIÓN

Un parámetro biológico central en el estudio de cualquier población animal es la asignación precisa del sexo. En los pingüinos, los machos son ligeramente más grandes que las hembras, pero muy similares, si no idénticos, en la coloración del plumaje (Renner y Davis, 1991). Asimismo, muchas especies de pingüinos muestran una considerable variación geográfica en el tamaño corporal (Williams, 1995). En particular, el género *Pygoscelis* muestra sólo un dimorfismo sexual leve (Agnew y Kerry, 1995). El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la utilidad en la determinación del sexo de un par de cebadores establecidos (2550F/2718R) (Fridolfsson y Ellegren, 1999) en pingüinos gentoo y Adélie. Estos cebadores amplifican la región del gen cromosoma-helicase de unión al ADN (*CHD*), el cual está ligado al cromosoma Z como al W. *CHD* se encuentra muy conservado y estos cebadores reconocen secuencias nucleotídicas exónicas. Esto permite observar diferencias de tamaño en los productos amplificados del gen *CHD* en los cromosomas W y Z, debido a que presentan longitudes diferentes en los intrones.

Para esta especie, el sexado molecular es un método atractivo ya que potencialmente puede proporcionar un medio preciso, no invasivo y rápido para la identificación sexual (Lessells y Mateman, 1996; Fridolfsson y Ellegren, 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Analizamos 46 ejemplares de *Pygoscelis papua* y 141 de *Pygoscelis adeliae* de la colonia Punta Stranger, 25 de Mayo, Isla King George (62° 16' S, 58° 37' W), Islas Shetland del Sur, dentro del Arrecife Antártico Especialmente Protegido N° 132 ("Península de Potter") durante la temporada 2011-2012. En esta colonia, aproximadamente 3.700 pares de Adélie y 4.990 pares de pingüinos gentoo se reproducen simpátricamente (Juárez *et al.*, 2016). Extrajimos una gota de sangre de la membrana interdigital y se almacenó en papel FTA®. Se incubó un disco de papel de 5 mm de diámetro en 100 ml de NaOH 50 mM a 99 ° C y luego se enfrió a 4° C. La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl con 10 x buffer (Invitrogen); 1,5 mM MgCl₂, 200 µM DNTPS; 2,5 U de polimerasa TaqDna y 0,25 picomoles de cada cebador, 1 µl (20 ng) de ADN molde y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. El perfil térmico comprendió una etapa de desnaturalización inicial de 94°

C durante 2 min, seguida de un ciclo único de 2 min a 94° C, 30 s a 5° C y 1 min a 72° C y 36 ciclos de 30 s a 92° C, 30 s a 50° C, 45 s a 72 ° C. Se añadió una etapa de extensión final de 72° C durante 5 min después del último ciclo. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa al 1% y se detectaron con *GelRed*TM.

RESULTADOS

Los cebadores 2550F/2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999), diseñados para detectar diferencias de intrones en *CHD1W* y *CHD1Z* mostraron diferencias de tamaño, y el sexo pudo determinarse en todos los individuos. Se obtuvo una única banda de machos y dos en hembras en geles de agarosa al 1%. Los tamaños estimados de las bandas fueron 663 y 743 pares de bases para *CHD1Z* y *CHD1W* genes respectivamente (Figura 1).

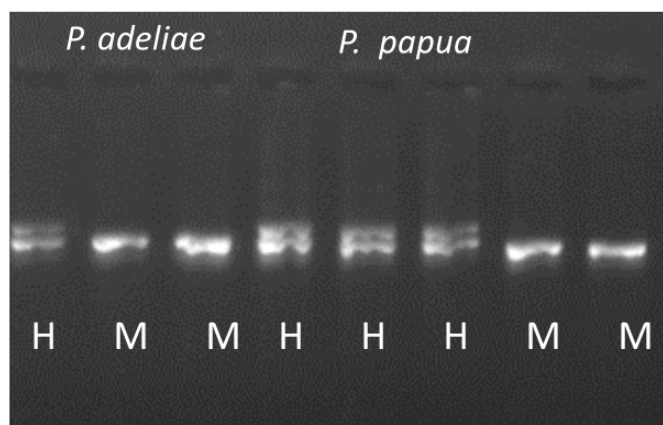


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Las tres primeras calles corresponden a *Pygoscelis adeliae* y las subsiguientes a *Pygoscelis papua*. Las hembras (H) son identificadas por la presencia de dos bandas y los machos (M) por sólo una.

DISCUSIÓN

De acuerdo con Dubiec y Zagalska-Neubauer (2006), el sexado molecular en estas especies basado en la técnica *CHD* es preciso, fácil, relativamente barato y rápido. El procesamiento de una muestra incluyendo la extracción de ADN, la PCR y la resolución de los productos de PCR en un gel puede tardar menos de 5 h. Los cebadores

2550F/2718R fueron adecuados para ambas especies. El diseño de estos últimos es tal que el fragmento W amplificado es el más pequeño, evitando así que las hembras sean incorrectamente tipificadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agnew D.J., Kerry R. (1995) Sexual dimorphism in penguins. In: Dann P., Norman I., Reilly P. (Eds.): The penguins. Surrey Beatty & Sons, Sydney, pp. 299-318.
- Dubiec A., Zagalska-Neubauer M. (2006) Molecular techniques for sex identification in birds. Biol. Lett. 43: 3-12.
- Fridolfsson A.K., Ellegren H. (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. J. Avian Biol. 30: 116-121.
- Juárez M.A., Santos M., Mennucci J.A., Coria N.R., Mariano-Jelicich R. (2016) Diet composition and foraging habitats of Adélie and gentoo penguins in three different stages of their annual cycle. Mar. Biol. 163:105.
- Lessells K., Mateman C. (1996) Molecular sexing of birds. Nature 383: 761-762.
- Renner M., Davis L. (1999) Sexing little Penguins *Eudyptula minor* from Cook Strait, New Zealand using discriminant function analysis. Emu 99: 74-79.
- Williams T.D. (1995) The penguins. Oxford University Press. New York, EEUU.

MIGRATIONS, ADMIXTURE AND GENETIC DIVERSITY IN CENTRAL ARGENTINIAN PATAGONIA: ANALYSIS OF AUTOSOMAL ALU POLYMORPHISMS

MIGRACIONES, MESTIZAJE Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA PATAGONIA CENTRAL ARGENTINA: ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS AUTOSÓMICOS ALU

Parolin M.L.^{1*}, Zanetti D.², Calò C.M.³, Esteban E.², Avena S.⁴, Carnese F.R.⁴, Moral P.²

¹Instituto de Diversidad y Evolución Austral, CCT CENPAT-CONICET, Puerto Madryn, Argentina.

²Departament Biologia Animal, Unitat d'Antropologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain.

³Dipartimento di Scienze della vita e dell' ambiente, Università de Cagliari, Sardegna Italia.

⁴Universidad Maimónides e Instituto de Ciencias Antropológicas, Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* corresponding author: parolin@cenpat-conicet.gob.ar

ABSTRACT

This study aimed to analyze autosomal Alu insertions in three localities from Patagonia Argentina belonging to the Andes region and the coast of the Chubut province. Knowledge of the genetic diversity of these populations, along with the genealogical data, will contribute to better understand historical information, differential migration process and bio-demographic composition of the Central Patagonia region. In order to achieve this objective, 16 autosomal Alu insertion polymorphisms were genotyped: ACE, APO-A1, TPA25, FXIIIIB, A25, HS4.32, D1, HS4.69, HS2.43, Sb19.12, Yb8NBC120, Sb19.3, Yb8NBC125, Ya5NBC221, DM, and CD4. Our results showed that the Central Patagonia region presents a complex continental genetic admixture with marked Native American roots ($39\% \pm 1.2$), Eurasian ($56\% \pm 1.73$) and, to a lesser extent, African ($5\% \pm 1.7$). The genetic proximity of the Patagonian samples in relation to groups from Europe and Northern Africa, but with a displacement towards the native communities, constitutes a clear indicator of the differential admixture process that took place in different regions of Argentina. Moreover, genetic differences were observed between Patagonian localities and Bahía Blanca (Central region of Argentina). These observations warned us that population genetic constitution analysis cannot be approached without bearing in mind the regional particularities, which are the result of the different historical, migratory, social-economic and demographic processes that occurs in the country.

Key words: Alu insertion polymorphisms, Argentina Central Patagonia, Admixture, Migrations

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo el análisis de las inserciones autosómicas Alu en tres localidades de la Patagonia argentina localizadas en la región andina y costera de la provincia de Chubut. El conocimiento de la diversidad genética de estas poblaciones, junto con los datos genealógicos, contribuirán a una mejor comprensión de la información histórica, los procesos migratorios diferenciales y la composición bio-demográfica de la región central Patagónica. Para alcanzar este objetivo se analizaron 16 polimorfismos autosómicos de inserción Alu: ACE, APO-A1, TPA25, FXIIIIB, A25, HS4.32, D1, HS4.69, HS2.43, Sb19.12, Yb8NBC120, Sb19.3, Yb8NBC125, Ya5NBC221, DM y CD4. Nuestros resultados mostraron que la región central Patagónica presenta una mezcla genética continental compleja de marcadas raíces nativo americanas $39\% (\pm 1.2)$, eurasiáticas $56\% (\pm 1.73)$ y, en menor medida, africanas $5\% (\pm 1.7)$. La proximidad genética de las muestras patagónicas a los grupos de Europa y del Norte de África, pero con un mayor desplazamiento hacia las comunidades nativas, constituye un claro indicador del proceso de mezcla diferencial que tuvo lugar en las distintas regiones de la Argentina. Por otra parte, las diferencias genéticas observadas entre las localidades de Patagonia y Bahía Blanca (región central de la Argentina), nos advierten que no puede analizarse la constitución genética de las poblaciones sin tener en cuenta las particularidades regionales, que son el resultado de los diferentes procesos históricos, migratorios, socio-económicos y demográficos que ocurrieron en el interior del país.

Palabras clave: Polimorfismos de inserción Alu, Patagonia Central Argentina, Mestizaje, Migraciones

Fecha de recepción: 20/02/2017
Fecha de aceptación de versión final: 25/10/2017

INTRODUCTION

Argentina has a history of widespread admixture among Native American, Eurasian and African groups, with particular characteristics in each region of the country (Toscanini *et al.*, 2007; Avena *et al.*, 2012; Parolin *et al.*, 2013a, 2015a; García *et al.*, 2015). Knowledge of the genetic composition of urban populations allows the reconstruction of the biological identity of their inhabitants, both at local and regional levels. At the same time, this information can be useful to understand the admixture events associated with different foundational histories, migrations and demographic changes that characterized the populations under study.

Previous studies carried out in the Central Patagonia region by means of blood systems analysis, showed an Eurasian contribution of 51%, a Native American contribution of 47%, and an African contribution of 2% in the Andean locality of Esquel (ESQ) (Avena *et al.*, 2010). The corresponding ancestral contributions were 59%, 37% and 4% respectively in Comodoro Rivadavia (CR) (Avena *et al.*, 2009) and 67%, 29% and 4% in Puerto Madryn (PM) (Parolin *et al.*, 2013b). More recently, by means of the analysis of 99 ancestry informative autosomal markers (AIMs) in a combination of samples from ESQ and CR, the above genetic composition was estimated to be 52% Eurasian, 44% Native American, and 4% African (Avena *et al.*, 2012). Likewise, through the study of 22 STR autosomal markers in samples from filiation cases from Chubut province, ancestral contributions were estimated as 50% European, 46% Native American and 4% African (Parolin *et al.*, 2015b). Uniparental genetic data obtained in Central Patagonia (Avena *et al.*, 2009, 2010; Parolin *et al.*, 2013b, 2014), supports the idea that in Argentina the native maternal participation rises towards the North (83–94%) and South of the country, including Patagonia (53–78%), and decreases to an average of 45% in the Central region. Meanwhile, the native paternal contribution is observed at a mean of 6% in every urban population studied by our research team, except for Northwest Argentina (NWA), with 17.3% (Di Fabio Roca *et al.*, 2016) and the Andean localities of ESQ, with 23% (Parolin *et al.*, 2013a), and San Carlos de Bariloche (SCB), with 18% (Parolin *et al.*, 2015a). Other authors have observed this same trend upon studying urban and rural areas from the center and North of Argentina (Martínez Marignac *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; García and Demarchi, 2009; Bailliet *et al.*, 2011; Motti *et al.*, 2013).

There is also a strong correlation between genetic data and the donors' genealogical information, and between genetic data and the historical and demographic data of each locality. In this regard, it has been observed that genetic contribution of foreign migrants (mainly from bordering countries) to the relatively small receptive populations, increases towards the South of the country. At local level, ESQ presents the largest proportion of grandparents and donors born in the same city and its area of influence, whereas TW and PM exhibit a larger number of internal migrants from other Argentinean regions, mainly from the center of the country, with larger European ancestry (Parolin *et al.*, 2013b). However, we point out the existence of an important Bolivian community inhabiting the lower valley of the Chubut River region (Rossini *et al.*, 2007). In addition, TW, CR and SCB present a strong influence of migrations from bordering countries, particularly of Chilean origin, with strong Native American ancestry (Bandieri, 2001; INDEC: Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010–<http://indec.mecon.ar>). Moreover, CR is the Patagonian city with the highest migratory flow from NWA, attracted by the large oil industry that characterizes the city. These differences observed from previous studies carried out in the interior of the same region and even in the same province, as it is the case of Chubut, cautioned us about the fact that the analysis of the genetic composition of the populations must take into consideration particularities of local and regional historical migrations.

Alu polymorphisms are repetitive DNA insertions of 300–1,000 bp which are spread along the human genome and constitute approximately 5% out of its total sequence. Their origin is estimated at around 65 million years BP and they are found exclusively in primates. These markers are especially useful in evolutionary studies because of a number of characteristics that they share: high stability, neutrality, known ancestral state and low propensity to exhibit homoplasy (Batzer and Deininger, 2002; Rishishwar *et al.*, 2015). These properties make the analysis of Alu insertions a tool of great utility for the analysis of biological relations among populations, reconstruction of historical processes, and population structures. Moreover, they have been successfully used as ancestry markers to estimate the geographic descent of the human populations (Luizon *et al.*, 2007).

Alu markers have been used to study Eurasian and African populations (Calò *et al.*, 2005; González-Pérez *et al.*

al., 2003, 2010; Hernando Herráez, 2010; Zanetti *et al.*, 2014) and, in a lesser extent, Native American groups (Battilana *et al.*, 2002, 2006; Dornelles *et al.*, 2004; Mateus-Pereira *et al.*, 2005; Gayà-Vidal *et al.*, 2010; Gómez-Pérez *et al.*, 2013). However, there are only three studies that make use of the Alu insertions as a tool for genetic-population analysis in Argentina: Martínez Marignac *et al.* (2004) analyzed two Alu markers and three autosomal SNPs to estimate continental admixture (European, African and native American ancestry) in a sample of La Plata city (Buenos Aires province), Resano *et al.* (2007) analyzed 19 Alu markers to estimate admixture fractions in a sample from Bahía Blanca city (Buenos Aires province), and Gómez-Pérez *et al.* (2011) analyzed eight autosomal Alu markers to characterize genetic diversity and population structure of the Jujuy province.

Motivated by the demonstrated utility of the Alu insertions in population genetic studies, we analyzed 16 autosomal Alu insertion polymorphisms (ACE, APO-A1, TPA25, FXIIB, A25, HS4.32, D1, HS4.69, HS2.43, Sb19.12, Yb8NBC120, Sb19.3, Yb8NBC125, Ya5NBC221, DM, and CD4) in three localities of Chubut province, Central Patagonia: one in the Andes region (Esquel) and the other two in the coast (Comodoro Rivadavia and Puerto Madryn).

Knowledge of the genetic composition of these populations will contribute to understand differential migration and admixture processes in different region of Argentina. At the same time, the knowledge of the genetic structure of a particular population could be a useful tool in biomedical research and forensic sciences.

MATERIALS AND METHODS

The populations

DNA of 150 non-related individuals from the cities of Esquel (ESQ; N= 50), Comodoro Rivadavia (CR; N= 50) and Puerto Madryn (PM; N= 50) were analyzed. ESQ is situated in the Andes region, whereas the other two cities are in the coastal area of the Chubut province, Central Patagonia, Argentina (Figure 1). Blood samples were taken, with prior signed informed consent, from volunteer donors who attended the hemotherapy services at public and private hospitals in each locality and signed a prior informed consent. The participants were thoroughly informed of the scopes of the study and answered a

questionnaire to obtain information about their birthplace and that of the two preceding generations (parents and grandparents). Five ml of whole blood were obtained from each donor and collected in vacutainer tubes with EDTA anticoagulant (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid). DNA was extracted by the phenol-chloroform method (Sambrook *et al.*, 1989). The protocols and procedures employed in this study were reviewed and approved by bioethics and educational committees of the Regional Hospital of CR, Sub-zonal Hospital of ESQ, and Zonal Hospital of PM.

Genotyping

Sixteen Alu insertion polymorphisms (FXIII, HS2.43, D1, HS4.69, A25, TPA25, APOA1, CD4, HS4.32, ACE, Sb19.3, Sb19.12, DM, Yb8NBC120, YbNBC125 and Ya5NBC221), distributed in nine autosomal chromosomes (N° 1, 3, 6, 8, 11, 12, 17, 19, 22; Table 1), were genotyped. Genotypes were scored by PCR amplification and subsequent electrophoretic migration in agarose gels. Primer sequences and amplification conditions were as previously described (Batzer and Deininger, 1991; Stoneking *et al.*, 1997; González-Pérez *et al.*, 2010). Each PCR reaction included positive and negative amplification controls. Genotype assignments were made by direct observation of 2% agarose gels (CD4, DM and FXIIB, at 1%) dyed with GelRed 0.5x under UV light.

Statistical Analysis

Analysis of allelic frequencies, heterozygosity indexes, Hardy-Weinberg equilibrium, differences between population pairs (Fisher's exact test), molecular analysis of variance (AMOVA) and the respective genetic distances (Reynolds *et al.*, 1983) were performed by using the Genetix v.4.05 software (Belkhir *et al.*, 2002) and Arlequin v3.1 (Excoffier and Lischer, 2010). Admixture estimations, based on the Eurasian-Native American-sub-Saharan trihybrid model, were performed using the ADMIX95 software (<http://genetica.fmed.edu.uy/software.htm>) which is based on the Chakraborty (1975) genetic identity method. Populations genetic affinities were analyzed by the construction of a principal components graph (PCA), based on Reynolds distances, by using the Rv3.1.1 FactoMineR (Josse, 2008) statistical package. The spatial genetic patterns were estimated through a geographically referenced spatial principal component analysis (sPCA). This method provides evidences of global or local genetic structures by considering



Figure 1. Geographical location of the studied populations. Esquel (ESQ) 42°54' S, 71°19' O; Comodoro Rivadavia (CR): 45°52' S, 67°30' O, and Puerto Madryn (PM): 42°49' S, 65°4' O. The Patagonia region is shaded in gray.

the geographic distances as well. Global patterns correspond to positive proper values, whereas negative proper values indicate local patterns that indicate considerable genetic differences among neighbors. The importance of global and local patterns was assessed by the Monte-Carlo test with 10,000 permutations, by using the R *adegenet* package (Jombart *et al.*, 2008).

Comparisons with other world populations

In order to analyze the genetic structure of the studied populations and the inter-population relationship, the results were compared with those previously obtained in Bahía Blanca and in twelve worldwide populations by other authors (Figure 2). These analyses were carried out using data from 10 Alu insertion polymorphisms shared in the sixteen populations studied (ACE, HS4.69, APOA1, CD4, HS4.32, Sb19.3, Sb19.12, Yb8NBC120, YbNBC125 and Ya5NBC221).

RESULTS

The allelic frequencies of 16 Alu insertions estimated in three Central Patagonia populations are detailed in Table 2. The highest insertion frequencies were recorded for the APOA1 locus in CR (0.98) and for the Ya5NBC221 locus in ESQ (0.94). Lowest frequencies were observed for the HS2.43 locus in the three studied populations (0.03 in CR to 0.07 in PM). Moreover, the lowest genetic diversity was recorded for the APOA1 locus in CR ($H = 0.04$) and the highest heterozygosity for the TPA25 locus ($H = 0.62$) in PM which, as expected, showed an intermediate value of insertion frequency (0.55).

We performed 48 tests (16 loci analyzed/population; $p\text{-value} = 0.001$). After Bonferroni correction, we could not reject the Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis for any of the sixteen Alu markers (nominal $p > 0.001$).

The AMOVA analysis indicated that most of the total genetic variation in the three studied populations was due to within population differences, whereas only 0.46% of the total genetic variation was due to differences among populations. The matrix of genetic distances based on Reynolds method (Reynolds *et al.*, 1983) did not exhibit significant differences (F_{ST} $p\text{-values} > 0.05$) among the studied Central Patagonia populations: CR *vs.* ESQ ($F_{ST} = 0.0027$; $p\text{-value} = 0.56$), CR *vs.* PM ($F_{ST} = 0.0051$; $p\text{-value} = 0.39$), PM *vs.* ESQ ($F_{ST} = 0.0102$; $p\text{-value} = 0.32$).

The studied populations were compared with thirteen worldwide populations, arranged in five groups according to geographic-population criteria: Europe, Sub-Saharan Africa, North Africa, Admixed America and Native American (Figure 2). The hierarchic AMOVA analysis was significant ($p\text{-value} < 0.0001$) with values of $F_{ST} = 0.13$ (difference among populations), $F_{SC} = 0.02$ (differences among populations and within groups), and $F_{CT} = 0.11$ (differences among population groups). These values might indicate the existence of a geographic structure in the analyzed populations. Such geographic structure was studied in more detail with an sPCA analysis. The values of the tests were, respectively, non significant for the global ($p\text{-value} = 0.27$), and significant for the local ($p\text{-value} = 0.02$). This differentiation found at local level might be due to the distinction between Northern Africa and sub-Saharan groups, since the test was not significant when the sample from the Ivory Coast (IC) was removed.

Table 1. Amplification characteristics of Alu polymorphisms.

Alu Polymorphism	Amplification primers	T ^a (°C)	Chr	PCR product size (pb)
TPA 25	5'-GTAAGAGTTCCGTAACAGGACAGCT-3' 5'-CCCCACCTAGGAGAACTTCTCTTT-3'	58	8	570/260
ACE	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	58	17	490/190
APO A1	5'-AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG-3' 5'-GTAAGAGTTCCGTAACAGGACAGCT-3'	50	11	~450/150
FXIII	5'-TCAACTCCATGAGATTTTCAGAAGT-3' 5'-CTGGAAAAAATGTATTCAGGTGAGT-3'	63	1	~800/500
D1	5'-TGCTGATGCCAGGGTTAGTAAA-3' 5'-TTTCTGCTATGCTCTTCCCTCTC-3'	70	3	~550/250
CD4	5'-AGGCCTTGTAGGGTTGGTCTGATA-3' 5'-TGCAGCTGCTGAGTGAAAGAACTG-3'	50	12	1501/1249
Sb19.3	5'-TCTAGGCCAGATTTATGGTAACTG-3' 5'-AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC-3'	60	19	456/154
Sb19.12	5'-TTAACATCCCTGCAACCCATC -3' 5'-GATTATAGTCACCCTGTTGTGC -3'	65	19	~600/300
A25	5'-CCACAAATAGGCTCATGTAGAAC -3' 5'-TATAATATGGCCTGGATTATACC -3'	63	8	~550/250
HS2.43	5'-ACTCCCCACCAGGTAATGGT-3' 5'-AGGGCCTTCATCCAGTTTGT -3'	64	1	482/184
HS4.69	5' – GTC TGA ATG TTC GTG TCC CC- 3' 5' – GTC CAA GTT CAA GGC ACC AG- 3'	64.5	6	601/289
HS4.32	5' – GTT TAT TGG GCT AAC CTG GG- 3' 5' – TGA CCT GCT AAC TTG TAC TTT AAC C- 3'	60	12	572/262
DM	5'- CTG TAT ACT CAG CTA CTA GGG T -3' 5'- AAA TAG GCT GGA CCG CGG -3' 5'- CTC AGG GGT TAT CTA AAG TGG C -3'	60	19	1008/494
Yb8NBC120	5'-CAGTGGATCTCCATTTTACCTCTC-3' 5'-GGAAAGGTTTCAGGAAGAAAGTG-3'	62	22	532/212
Yb8NBC125	5'-AGCCAGAAACCCTGAACAAG-3' 5'-AAAGGCCCCAGAAGTATACCA-3'	62	22	415/97
Ya5NBC221	5'-CAGTTTTCCATATACATGTGGGTTTC-3' 5'-TAGTGTTAAGAGGCCCATTTTCTAC-3'	60	22	640/313

T^a: Annealing temperature; Chr: chromosome location; PCR product size of Alu-containing/Alu-lacking allele; pb: pairs of bases.

The genetic distance matrix obtained with Reynolds *et al.* (1983) index exhibited significant differences ($p\text{-fst} < 0.05$) between the populations of the present study and those from the rest of the world. However, relatively low genetic distances were observed among the Central Patagonia and Bahía Blanca populations (variation range $F_{ST} = 0.006\text{--}0.013$), and between populations from Southern and Central Spain (variation range = 0.033–

0.048), whereas larger genetic distances were observed between the Patagonian and Native American populations (variation range = 0.094–0.122). On the other hand, the highest distances were observed between the Patagonian and Sub-Saharan (IC) populations (variation range = 0.192–0.219), highlighting the outlier position of the latter. The graphic representation of the distances matrix first shows a cluster among the Central Patagonia samples and then

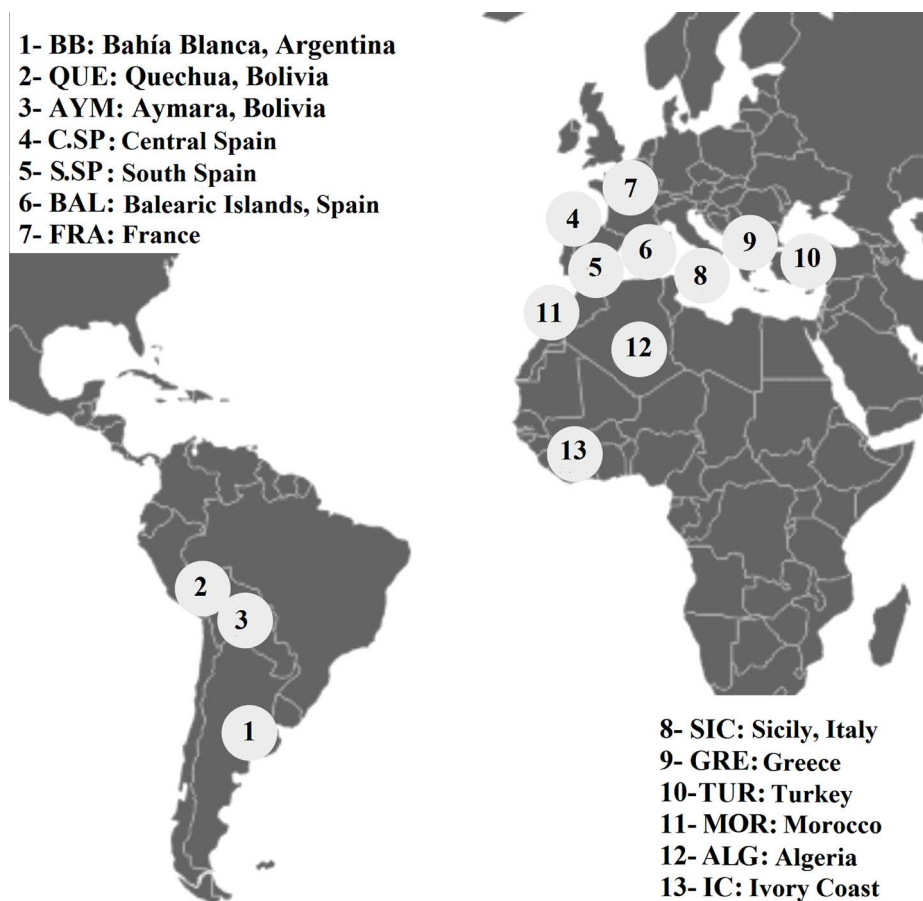


Figure 2. Thirteen worldwide populations taken from the literature for comparative purposes. 1-BB: Bahía Blanca (Resano *et al.*, 2007); 2-QUE: Quechua and 3-AYM: Aymara (Gayà-Vidal *et al.*, 2010); 4-C.SP: Central Spain, 5-S.SP: Southern Spain, 6-BAL: Balearic Islands, 7-FRA: France, 8-SIC: Sicily, 9-GRE: Greece, 10-TUR: Turkey, 11-MOR: Morocco, 12-ALG: Algeria and 13-IC: Ivory Coast (González-Pérez *et al.*, 2010).

with Southern Buenos Aires (BB), with an intermediate position among the Native American, Northern African and European groups (Figure 3A). The first two axes represented 73.4% of the total genetic variance. The first component, including 46.9% of the total variance, clustered the Argentinian populations in a position intermediate between the two Native Bolivian populations and the European and Northern African populations. The second component (26.4%) allowed the distinction of the sub-Saharan African population from the rest of the European, Northern African and South American populations. When the analysis was repeated to eliminate the effect of the Ivory Coast sample, the observed pattern was essentially the same (Figure 3B).

Based on the trihybrid admixture model of the Latin American populations, the allelic frequencies of 10 Alu

loci from Europeans (average C.SP, S.SP, and SIC), Africans (IC) and native Americans (average QUE and AYM) were used to represent the parental populations; the respective references are described in Figure 2. The total Central Patagonia sample had an Eurasian contribution of 56% ($\pm 1.7\%$), African contribution of 5% ($\pm 1.7\%$), and Native American contribution of 39% ($\pm 1.2\%$). At the local level, those contributions were respectively 58% Eurasian ($\pm 2.4\%$), 1.5% African ($\pm 2.2\%$), and 40.5% Native American ($\pm 2.0\%$) in CR city. In ESQ, the contributions were 54.4% ($\pm 5.5\%$) Eurasian, 3.3% ($\pm 1.2\%$) African and 42.3% ($\pm 3.6\%$) Native. Finally, in PM, those values were 56% ($\pm 1.2\%$) Eurasian, 5% ($\pm 4.8\%$) African, and 39% ($\pm 1.0\%$) Native American.

Genealogical information obtained for each sample demonstrates local differences in the relationship

Table 2. Alu insertion frequencies, heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium in three localities of Central Patagonia (Exact test).

Locus	Localities								
	Comodoro Rivadavia			Esquel			Puerto Madryn		
	Insertion	H	p-HW	Insertion	H	p-HW	Insertion	H	p-HW
TPA25	0.500	0.500	1.000	0.582	0.388	0.151	0.550	0.620	0.150
ACE	0.550	0.420	0.268	0.594	0.396	0.237	0.510	0.449	0.568
APOA1	0.979	0.043	1.000	0.957	0.085	1.000	0.907	0.140	0.300
D1	0.533	0.457	0.564	0.404	0.255	0.002	0.479	0.250	0.001
CD4	0.883	0.191	0.483	0.840	0.200	0.089	0.819	0.277	0.626
Sb19.3	0.673	0.408	0.744	0.700	0.440	1.000	0.720	0.440	0.730
Sb19.12	0.255	0.347	0.476	0.228	0.283	0.206	0.148	0.200	1.000
A25	0.044	0.089	1.000	0.085	0.170	1.000	0.090	0.140	0.326
HS2.43	0.031	0.063	1.000	0.041	0.082	1.000	0.070	0.140	1.000
HS4.69	0.163	0.327	0.326	0.214	0.388	0.425	0.240	0.480	0.046
HS4.32	0.616	0.395	0.333	0.541	0.469	0.776	0.417	0.292	0.007
Yb8NBC120	0.375	0.500	0.765	0.362	0.383	0.340	0.407	0.535	0.751
YbNBC125	0.110	0.300	0.574	0.080	0.160	1.000	0.070	0.100	0.201
Ya5NBC221	0.878	0.082	0.001	0.937	0.125	1.000	0.930	0.140	1.000
FXIIIB	0.446	0.457	0.765	0.553	0.298	0.008	0.349	0.333	0.136
DM	0.324	0.529	0.429	0.397	0.517	1.000	0.317	0.500	0.674
Mean H	0.319 ± 0.166			0.290 ± 0.137			0.315 ± 0.163		

H: average heterozygosity; p-HW: Hardy-Weinberg equilibrium significance, Bonferroni correction ($p\text{-value } 0.05/48 = 0.001$).

between the place of birth and geographic origin of the grandparents. In this sense, Figure 4 shows that the origin of the grandparents is mainly local in ESQ, from the Central region in PM, and from Chile in CR, whereas the origin

ranking in the second place is Chile in PM, and Europe in CR and PM. In a lesser extent, other South American grandparents came from Bolivia, Paraguay, Uruguay, and Brazil.

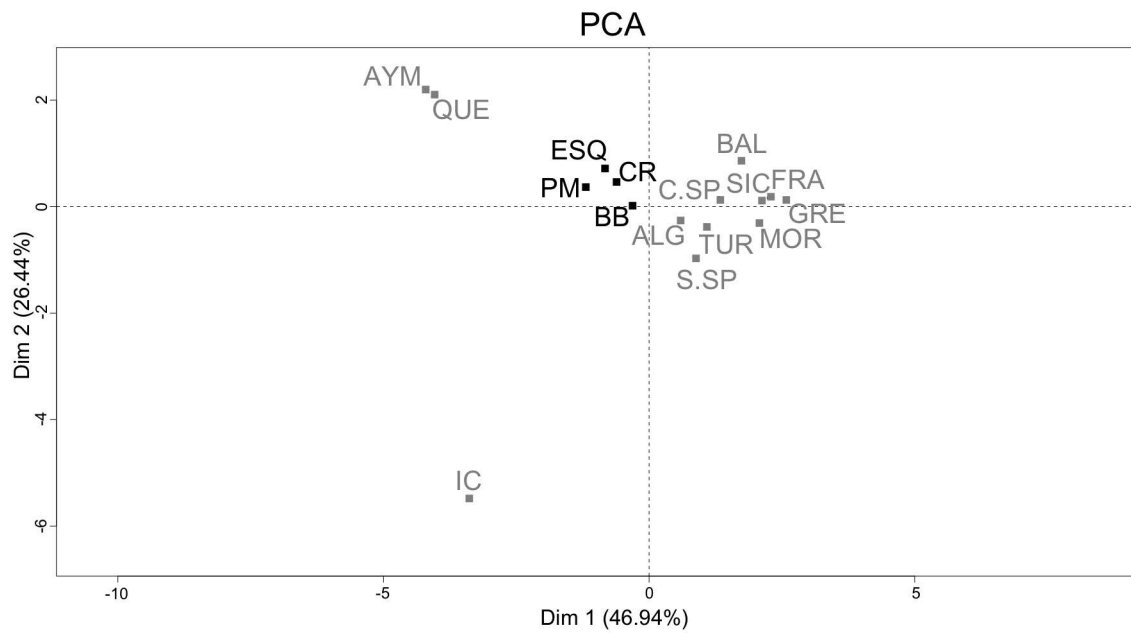


Figure 3A. Graphic representation of the genetic distances matrix based on Reynold *et al.* (1983) distances. Abbreviations of the analyzed populations are described in Figure 2.

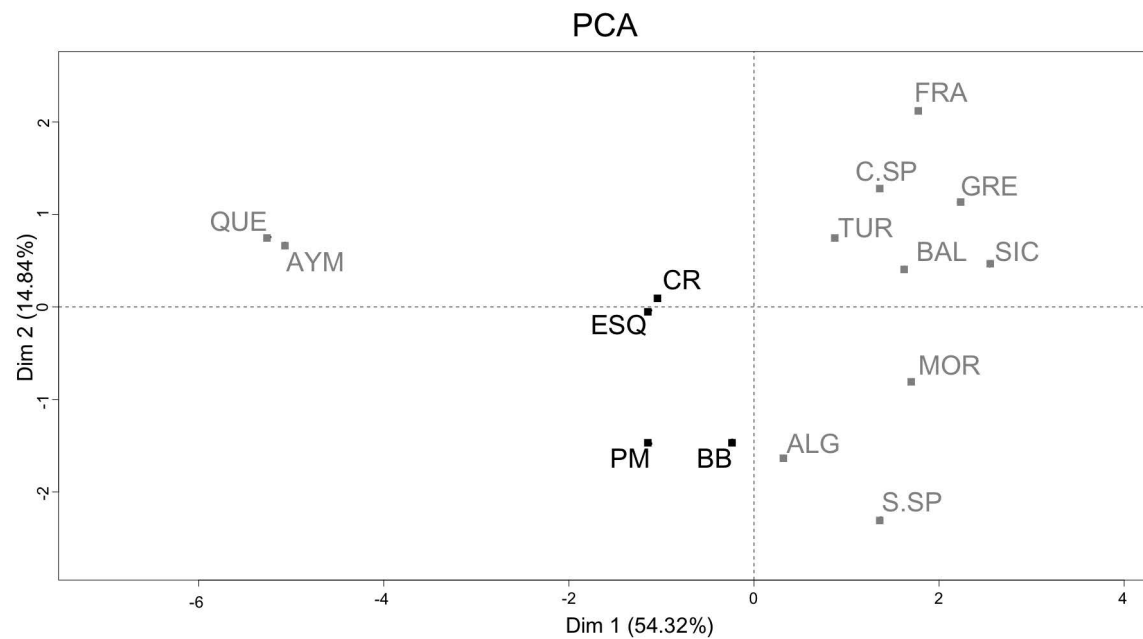


Figure 3B. Graphic representation of the genetic distance matrix based on Reynold *et al.* (1983) distances excluding the South African sample (IC: Ivory Coast). Abbreviations of the analyzed populations are described in Figure 2.

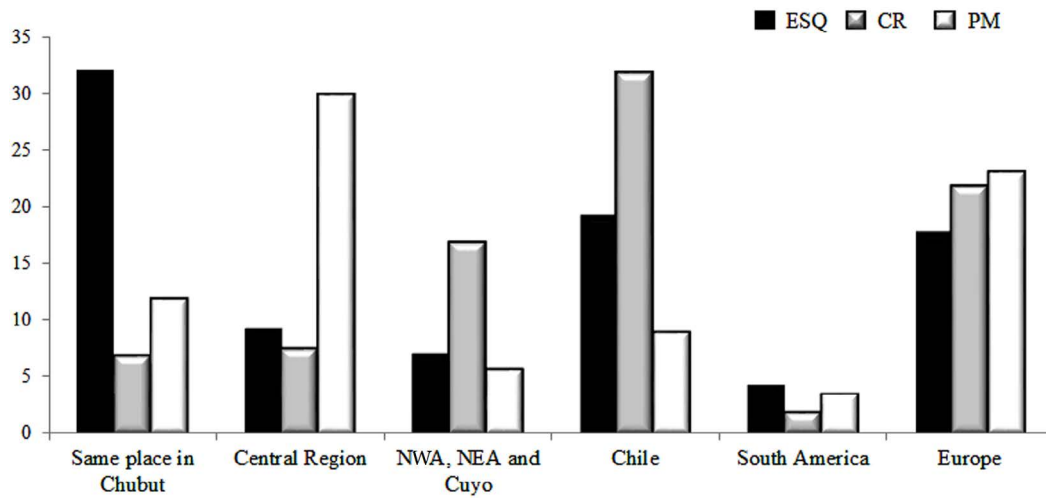


Figure 4. Birthplace of grandparents.

DISCUSSION

This research constitutes the first genetic characterization of urban populations in the Argentinian Patagonia by means of analysis of Alu insertion polymorphisms. The Argentinian population presents a widespread multiple continental admixture with Native American, Eurasian and, to a lesser extent, African roots. In this sense, the Central Patagonian region is not an exception, as it has been shown previously in studies of uniparental and biparental genetic heritage markers (Avena *et al.*, 2009, 2010, 2012; Parolin *et al.*, 2013a,b, 2014, 2015a,b).

In order to complement the previously mentioned studies, 16 Alu markers were analyzed. The insertion frequencies and the average heterozygosity values were similar to those previously recorded in the Argentinian locality of Bahía Blanca (Resano *et al.*, 2007) and, in general, in Northern Africa and Spain populations (González-Perez *et al.*, 2010). Nevertheless, the CD4 locus presented a higher insertion frequency and a significantly lower heterozygosity value than in previous studies. In this regard, it has been observed that the insertion frequency of CD4 is close to 1.00 in native groups from South America (Gayà-Vidal *et al.*, 2010). The comparatively high frequency of the ancestral allele CD4 might be related to the autoctonous contribution in the analyzed populations.

Regarding the genetic differentiation observed at local level, the variation observed in the analyzed Alu markers

only presents local discontinuities in the African continent, while these markers are not indicators of significant genetic heterogeneities in the other continents.

The admixture estimation based on the trihybrid model showed that the Central Patagonian sample registered an autoctonous contribution ($36.5\% \pm 1.9\%$) higher than the one previously obtained for Southern Buenos Aires province ($20.9\% \pm 4.8\%$). This fact might be related to the late incorporation of Patagonia to the country (Law 1532, 1884), which allowed the native populations to keep their autonomy for a longer period than other native groups. It could also be related to the constant migratory flow that the Patagonian region receives from inland provinces and from bordering countries, mainly from Chile, whose populations has a large native ancestry (Bandieri, 2001; Eyheramendy *et al.*, 2015; Gómez-Carballa *et al.*, 2016). Nonetheless, possible variations due to chance related to sample size and to the type and quantity of the analyzed genetic markers cannot be discarded.

Likewise, the admixture results obtained at the local level are related to the geographic origin of the ancestors and to the foundational history of each analyzed population. This is reflected in the genealogical data that show clear differences in the geographical origin of the migrant grandparents by locality. In this sense, it was observed that, in ESQ, there is a higher frequency of birth in which the grandparents were also locally born. This fact could be related to a slow growth of the region and a

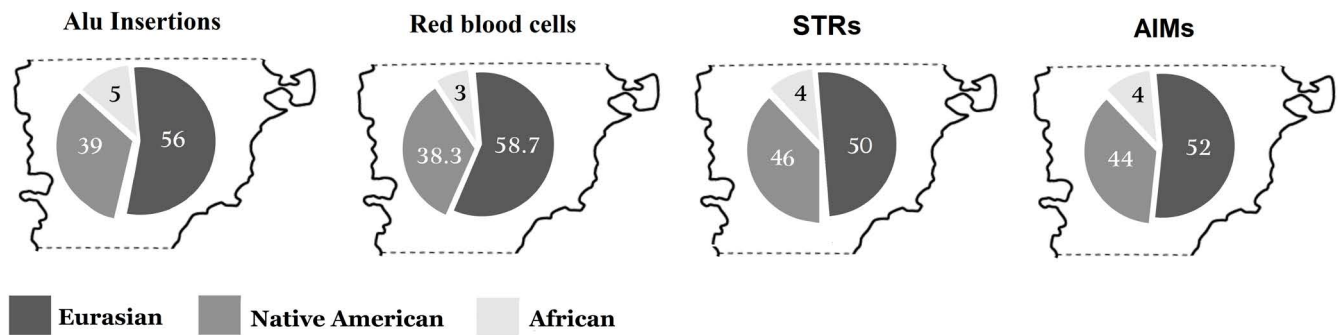


Figure 5. Percentage of the estimated genetic admixture in the Central Patagonia region for four autosomal systems.

better preservation of the autoctonous origin (Finkelstein and Novella, 2006). Since before its foundation (1906) and to present days, ESQ has maintained an intense trade with Chile, being a zone of transport and gateway of migrants in both sides of the Andes mountain range. ESQ has had a gradual and diversified growth, also having agroforestry and tourism as its most important economic activities (Avena *et al.*, 2010). CR has had significant contributions of grandparents from Chile and northern provinces of Argentina. Both immigrant groups, which have large native ancestry (Avena *et al.*, 2012; Bandieri, 2001; Eyheramendy *et al.*, 2015; Gómez-Carballa *et al.*, 2016; Gómez-Pérez *et al.*, 2011; Ramallo *et al.*, 2011), participated in strong migratory waves attracted by the exponential growth of the oil industry, which started in 1907 and is still ongoing (Avena *et al.*, 2009).

On the other hand, PM presents the higher proportion of grandparents from the central region of the country (30%), who have mostly European ancestry (Avena *et al.*, 2012), and 23% grandparents born in that continent. This fact is related to the migration of qualified laborers for the aluminum industry, mainly from the inner provinces of the country, and also to the foundational history of PM, with Welsh, Spanish and Italian roots. Nonetheless, we must indicate that, during the last two decades, an important migration from Bolivia has taken place, representing the migrants from that country 36% of the total coming from Latin America (INDEC: www.indec.mecon.ar). The Bolivian community harbors a considerable fraction of autoctonous ancestry (Heinz *et al.*, 2013) and, nowadays, it is estimated that they represent 5.6% of the South American migrants in the Patagonian region (Castillo and Gurrieri, 2012). The three cities included in then present

study have less than 150 years of existence; therefore the migrations have been very important in the growth of their populations. ESQ is located in a much more humid area than the other two cities, at the foot of Andes mountain range. PM and CR are located in the coast, in a much drier area. The density of the native population was much higher in the mountain range than in the coast; this also explains that the native contribution has a local origin, being high the correspondence with the recorded genealogical information. Thus, although the percentage of Native American contribution was similar in the three cities, the source of that contribution is different.

The genetic affinities among the populations based on the Reynolds *et al.* (1983) distances and their graphical representation in the correspondent PCA show a genetic proximity between the studied samples and the Bahía Blanca population. This may be due in part to the geographic nexus between Patagonia and Buenos Aires province, which favors a migratory flow between both regions. In a similar way, the genetic proximity of the Central Patagonian samples and the Northern African and European groups, but with a shift towards the autoctonous communities, constitutes a clear indicator of the character of the differential admixture process that took place in the different regions of Argentina. Even though no significant differences have been observed among the populations of the Central Patagonia region, we would like to highlight the importance of having genealogical data to better understand and contextualize the genetic data. This information together with the historical and demographic data caution us that the analysis of the genetic makeup of the populations should be approached bearing in mind the local and regional particularities, which are the result

of different historical, migratory, and social and economic processes. For example, this information helps us to understand that the main source of the autochthonous contribution was local in ESQ, Chilean in CR and of various origins in PM.

Finally, our results highlight the usefulness of Alu markers as a tool for the study of the biological relations and the analysis of genetic population admixture. Our results are also in agreement with the Eurasian, African and Native American contributions previously observed in the same populations for blood group systems (Avena *et al.*, 2009, 2010; Parolin *et al.*, 2013b), or using STRs (Parolin *et al.*, 2015b) and in 99 individual ancestry informative markers (Avena *et al.*, 2012) (Figure 5). In conclusion, this study reveals the utility of Alu insertion polymorphisms as a complementary tool for population genetic analysis, being a simple and economical molecular technique. Also, this study shows the need to increase biparental genetic information for American urban and rural populations, which will contribute to better understand the complex migratory and heterogeneous admixture processes observed in Latin American populations.

BIBLIOGRAPHY

- Avena S.A., Parolin M.L., Boquet M., Dejean C.B., Postillone M.B., Alvarez Trentini Y., Di Fabio Rocca F., Mansilla E., Jones L., Dugoujon J.M., Carnese F.R. (2010) Mezcla génica y linajes uniparentales en Esquel (Prov. de Chubut). Su comparación con otras muestras poblacionales Argentinas. *J. Basic Appl. Genet.* 21: 01-14.
- Avena S.A., Parolin M.L., Dejean C.B., Ríos Part M.C., Fabrikant G., Goicoechea A.S., Dugoujon J.M., Carnese F.R. (2009) Mezcla génica y linajes uniparentales en Comodoro Rivadavia (Provincia de Chubut, Argentina). *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 11: 25-41.
- Avena S., Via M., Ziv E., Gignoux C.R., Dejean C., Huntsman S., Torres-Mejía G., Dutil J., Matta J.L., Beckman K., Burchard E.G., Parolin M.L., Goicoechea A., Acreche N., Boquet M., Fernandez V., Rey J., Stern M.C., Carnese R.F., Fejerman L. (2012) Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *Plos One* 7 (4): e34695.
- Bailliet G., Ramallo V., Muzzio M., Santos M.R., Motti J.M.B., Bianchi N.O., Bravi C.M. (2011) Antecedentes y nuevos aportes en el estudio del Cromosoma Y en poblaciones humanas Sudamericanas. *J. Basic Appl. Genet.* 22: 1-9.
- Bandieri S. (2001) Cruzando la cordillera: La frontera argentino-chilena como espacio social. En: Torres SB. (Ed.) *La migración chilena en la Patagonia Austral en la primera mitad del siglo XX y su inserción en los centros urbanos de Comodoro Rivadavia, Río Gallegos y Ushuaia*. Centro de Estudios de Historia Regional (CEHIR), Facultad de Humanidades, Universidad del Comahue, Neuquén, Argentina pp. 421-458.
- Battilana J., Bonatto S.L., Freitas L.B., Hutz M.H., Weimer T.A., Callegari-Jacques S.M., Batzer M.A., Hill K., Hurtado A.M., Tsuneto L.T., Petzl-Erler M.L., Salzano F.M. (2002) Alu insertions versus blood group plus protein genetic variability in four Amerindian populations. *Ann. Hum. Biol.* 29: 334-347.
- Battilana J., Fagundes N.J., Heller A.H., Goldani A., Freitas L.B., Tarazona-Santos E., Munkhbat B., Munkhtuvshin N., Krylov M., Benevolenskaia L., Arnett F.C., Batzer M.A., Deininger P.L., Salzano F.M., Bonatto S.L. (2006) Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. *Ann. Hum. Biol.* 33: 142-60.
- Batzer M.A., Deininger P.L. (1991) A human-specific subfamily of Alu sequences. *Genomics* 9: 481-487.
- Batzer M.A., Deininger P.L. (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3: 370-379.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2002) GENETIX 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Calò C.M., Piras I.S., Moral P., Falchi A., Ghiani M.E., Varesi L., Vona G. (2005) Analisi molecolare delle popolazioni del Mediterraneo attraverso 11 inserzioni Alu. *Antrop.* 9: 1-12.

- Castillo J., Gurrieri J. (2012) El panorama de las migraciones limítrofes y del Perú en la Argentina en el inicio del siglo XXI. En: El impacto de las migraciones en Argentina. Cuadernos migratorios N° 2. Artola J., Gurrieri J., Ezequiel T., Camino A., Vaca V. (Eds.) Organización Internacional para las Migraciones. Editorial Oficina regional para América del Sur, Ciudad Autónoma de Jujuy pp. 365.
- Chakraborty R. (1975) Estimation of race admixture: A new method. *Am. J. Phys. Anthropol.* 42: 507-511.
- Di Fabio Roca D.F., Albeza M.V., Postillone B.M., Acreche N., Lafage L., Parolín M.L., Dejean C., Carnese F.R., Avena S. (2016) Historia poblacional y análisis antropogenético de la ciudad de Salta. *ANDES: Antropología e Historia*. En prensa.
- Dornelles C.L., Battilana J., Fagundes N.J.R., Freitas L.B., Bonatto S.L., Salzano F.M. (2004) Mitochondrial DNA and Alu insertions in a genetically peculiar population: The Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay. *Am. J. Hum. Biol.* 16: 479-488.
- Excoffier L., Lischer H.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-7.
- Eyheramendy S., Martínez F.M., Vial C., Repetto G.M. (2015) Genetic structure characterization of Chileans reflects historical immigration patterns. *Nature Communications* 6: 6472.
- Finkelstein D., Novella M.M. (2006) Actividades económicas y proceso de construcción social en las áreas andinas de Río Negro y Chubut. En: Bandieri S., Blanco G., Varela G. (Eds.) Hecho en Patagonia. La historia en perspectiva regional. Editorial Educo-Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, pp. 191-209.
- García A., Demarchi D.A. (2009) Incidence and Distribution of Native American mtDNA haplogroups in Central Argentina. *Hum. Biol.* 81: 59-69.
- García A., Demarchi D., Tovo-Rodrigues L., Pauro M., Callegari-Jacques S., Salzano F., Hutz M. (2015) High interpopulation homogeneity in Central Argentina As Assessed by Ancestry Informative Markers (AIMs). *Gen. Mol. Biol.* 38: 324-331.
- Gayà-Vidal M., Dugoujon L.M., Esteban E., Athanasiadis G., Rodríguez A., Villena M., Vasquez R., Moral P. (2010) Autosomal and X Chromosome Alu insertions in Bolivian Aymaras and Quechuas: two languages and one genetic pool. *Hum. Biol.* 22: 154-62.
- Gómez-Carballa A., Moreno F., Álvarez-Iglesias V., Martín-Torres F., García-Magariños M., Pantoja-Astudillo J.A., Aguirre-Morales E., Bustos P., Salas A. (2016) Revealing latitudinal patterns of mitochondrial DNA diversity in Chileans. *Forensic Sci. Int. Genet.* 20: 81-88.
- Gómez-Pérez L., Alfonso-Sánchez M.A., Dipierri J.A., Alfaro E., García-Obregón S., De Pancorbo M.M., Bailliet G., Peña J.A. (2011) Microevolutionary processes due to landscape features in the province of Jujuy (Argentina). *Am. J. Hum. Biol.* 23: 177-84.
- Gómez-Pérez L., Alfonso-Sánchez M.A., Dipierri, J.E., Sánchez D., Espinosa I., De Pancorbo M.M., Peña J.A. (2013) Young *Alu* insertions within the MHC class I region in Native American populations: Insights into the origin of the MHC-*Alu* repeats. *Am. J. Hum. Biol.* 25: 359-365. doi:10.1002/ajhb.2237.
- González-Pérez E., Via M., Esteban E., López-Alomar A., Mazieres S., Harich N., Kandil M., Dugoujon J.M., Moral P. (2003) Alu insertions in the Iberian Peninsula and north west Africa-genetic boundaries or melting pot. *Coll. Antropol.* 27: 491-500.
- González-Pérez E., Esteban E., Via M., Gayà-Vidal M., Athanasiadis G., Dugoujon J.M., Luna F., Mesa M.S., Fuster V., Kandil M., Harich N., Bissar-Tadmouri N., Saetta A., Moral P. (2010) Population relationships in the Mediterranean revealed by autosomal genetic data (Alu and Alu/STR compound systems). *Phys. Anthropol.* 141: 430-439.
- Heinz T., Álvarez-Iglesias V., Pardo-Seco J., Taboada-Echalar P., Gómez-Carballa A., Torres-Balanza A.,

- Rocabado O., Carracedo A., Vullo C., Salas A. (2013) Ancestry analysis reveals a predominant Native American component with moderate European admixture in Bolivians. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7: 537-542.
- Hernando Herráez I. (2010) Caracterización genética de las poblaciones de Valencia y Menorca mediante polimorfismos Alu. Tesis de Maestría en Biología Humana, Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España.
- INDEC (2010) Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas. www.indec.mecon.ar.
- Jombart T., Devillard S., Dufour A.B., Pontier D. (2008) Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity. Edinb.* 101: 92-103.
- Josse J. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25: 1-18.
- Luizon M.R., Mendes-Junior C.T., De Oliveira S.F., Simões A.L. (2007) Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Council.* 20: 86-90.
- Martínez Marignac V.L., Bertoni B., Parra E.J., Bianchi N.O. (2004) Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Hum. Biol.* 76: 543-57.
- Mateus Pereira L.H., Socorro A., Fernandez I., Masleh M., Vidal D., Bianchi N.O., Bonatto S.L., Salzano E.M., Herrera R.J. (2005) Phylogenetic information in polymorphic L1 and Alu insertions from East Asians and Native American populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1: 171-184.
- Motti J.M.B., Muzzio M., Rodenak Kladniew B., Alfaro E.L., Dipierri J.E., Bailliet G., Bravi C.M. (2013) Origen y distribución espacial de linajes maternos nativos en el noroeste y centro oeste argentinos. *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 15: 3-14.
- Parolin M.L., Avena S.A., Di Fabio Rocca F. (2013a) Análisis de la variación regional en el proceso de mestizaje de la Argentina. *J. Basic Appl. Genet. Supp.* 24: 30.
- Parolin M.L., Avena S.A., Fleischer S., Pretell M., Di Fabio Rocca F., Rodríguez D.A., Dejean C.B., Postillone M.B., Vaccaro M.S., Dahinten S.L., Manera G., Carnese F.R. (2013b) Análisis de la diversidad biológica y mestizaje en la ciudad de Puerto Madryn (Prov. de Chubut, Argentina). *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 15: 61-75.
- Parolin M.L., Basso N.G., Avena S.A. (2014) Mestizaje en la Patagonia Argentina: Diversidad genética y poblamiento de Trelew (Prov. Chubut). *Basic Appl. Genet. Supp.* 25: 250.
- Parolin M.L., Toscanini U., Lull. C. (2015a) No tan aislados: el componente nativo presente en poblaciones cosmopolitas de la Patagonia Argentina. Simposio: Historia y prehistoria de los Pueblos Patagónicos contada por el ADN. Libro de resúmenes, XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, Valdivia, e9.
- Parolin M.L., Real L.E., Martinazzo L.B., Basso N.G. (2015b) Population genetic analyses of the Powerplex® Fusion kit in a cosmopolitan sample of Chubut Province (Patagonia Argentina). *Forensic Sci. Int. Genet.* 19: 221-222.
- Ramallo V., Salceda S., Bailliet G. (2011) Apellidos, familias y linajes moleculares: el caso de Azampay, Catamarca. *RUNA* 23: 163-184.
- Resano M., Esteban E., González-Pérez E., Vía M., Athanasiadis G., Avena S., Goicoechea A., Bartomioli M., Fernández V., Cabrera A., Dejean C., Carnese F., Moral P. (2007) How many populations set foot through the Patagonian door? Genetic composition of the current population of Bahía Blanca (Argentina) based on data from 19 Alu polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.* 19: 827-385.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>.
- Parolin M.L., Avena S.A., Di Fabio Rocca F. (2013a) Análisis

- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- Rishishwar L., Tellez Villa C.E., King Jordan I. (2015) Transposable element polymorphisms recapitulate human evolution. *Mob DNA* doi:10.1186/s13100-015-0052-6.
- Rossini O., Bonelli L., Kovacic G. (2007) Chagas en Puerto Madryn, Chubut. Retrospectiva de los últimos 12 años. <http://chubut.gov.ar>.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Stoneking M., Fontius J.J., Clifford S.L., Soodyall H., Arcot S.S., Saha N., Jenkins T., Tahir M.A., Deininger P.L., Batzer M.A. (1997) Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. *Genome Res.* 7: 1061-1071.
- Toscanini U., Gusmão L., Berardi G., Amorim A., Carracedo A., Salas A., Raimondi E. (2007) Testing for genetic structure in different urban Argentinian populations. *Forensic Sci. Int.* 165: 35-40.
- Wang S., Ray N., Rojas W., Parra M.V., Bedoya G., Gallo C. (2008) Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet.* 4: e1000037. doi:10.1371/journal.pgen.1000037.
- Zanetti D., Sadiq M., Carreras-Torres R., Khabour O., Alkaraki A., Esteban E., Via M., Moral P. (2014) Human Diversity in Jordan: Polymorphic Alu Insertions in General Jordanian and Bedouin Groups. *Hum. Biol.* 86: 131-138.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CUATRO POBLACIONES DE OVINOS CRIOLLOS DE ARGENTINA

GENETIC CHARACTERIZATION OF FOUR POPULATIONS OF ARGENTINIAN CREOLE SHEEP

Peña S.^{1,5*}, Martínez A.², Villegas Castagnasso E.³, Aulicino M.^{1,4}, Género E.R.^{1,5}, Giovambattista G.³, Martínez R.D.^{1,5}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Argentina.

² Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España.

³ IGEVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

⁴ IFSC, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de La Plata, Argentina.

⁵ IIPAAS, Instituto de Investigación Agropecuaria, Ambiente y Salud, FCA-UNLZ, Argentina.

*Autor correspondiente: sabp03@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Creole sheep are the founders of sheep farming in Argentina and have contributed in a sustained way to the economic, social and cultural development of some regions of this country. However, it is a scarcely valorised and poorly studied genetic resource. In order to genetically characterize the Argentinian Creole sheep, DNA samples were taken from four representative populations located in the provinces of Buenos Aires, Corrientes, Santiago del Estero and Salta. These flocks were selected because they are considered to be conserved groups, they have the phenotypic characteristics of the creole breed and there are no records about the introduction of animals of other breeds into those systems. A total of 30 microsatellites and the D-loop region of mitochondrial DNA were analysed. Microsatellite analysis showed high level of genetic diversity within populations ($H_o = 0.676$; $H_e = 0.685$; $PIC = 0.713$). This variability is explained by differences between molecular patterns of the studied individuals, which can be classified into three significantly different population groups: BA, SA, SE+CO. Since these populations explain very little of the total variability (7.6%), it can be considered that they belong to a same race. The analysis of the mitochondrial D-loop showed that Argentinian Creole sheep have haplotypes belonging to the Asian haplogroup, which is widely distributed in the Spanish breeds, which are considered to be their ancestors. The results obtained in the present study will provide information to develop management criteria for this genetic resource in Argentina, in order to implement their conservation, recovery and/or to develop breeding programs.

Key words: Sheep, genetic variability, microsatellites, mitochondrial DNA

RESUMEN

Los ovinos criollos son los fundadores de la ganadería ovina en la Argentina y han contribuido de manera sostenida al desarrollo económico, social y cultural de algunas regiones del país. A pesar de ello, es un recurso zoogenético escasamente valorizado y por ende poco estudiado. En orden de caracterizar genéticamente a los ovinos criollos argentinos, se tomaron muestras de ADN de cuatro poblaciones representativas localizadas en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Santiago del Estero y Salta. Estas majadas se seleccionaron por ser grupos conservados, que presentan las características fenotípicas de la raza y no registran la introducción de animales de otras razas en el sistema de reproducción. Un total de 30 marcadores microsatélites y la región D-loop del ADN mitocondrial fueron analizados. El análisis de los microsatélites permitió evidenciar una alta diversidad genética intrapoblacional ($H_o = 0,676$; $H_e = 0,685$; $PIC = 0,713$). Dicha variabilidad es explicada por diferencias entre los patrones moleculares de los individuos estudiados que pueden clasificarse en 3 grupos de poblaciones significativamente diferentes: BA, SA, SE+CO. Dado que dichas poblaciones explican muy poco de la variabilidad total (7,6%), ellas deberían considerarse perteneciente a una misma raza. El análisis del D-loop mitocondrial demostró que los individuos analizados están relacionados con el haplogrupo asiático, el cual está ampliamente distribuido en las razas españolas que son las antecesoras de la raza criolla argentina. Los resultados obtenidos en este trabajo proveerán información para establecer criterios de manejo de este recurso genético de Argentina con el fin de implementar planes de conservación, recuperación y/o mejora de los programas.

Palabras clave: Ovejas, variabilidad genética, microsatélites, ADN mitocondrial

Fecha de recepción: 30/12/2016
Fecha de aceptación de versión final: 23/11/2017

INTRODUCCIÓN

Los ovinos criollos son los fundadores de la ganadería ovina en la Argentina y han contribuido de manera sostenida al desarrollo económico, social y cultural de las más diversas regiones de este país. En cuanto a su número actual conforman la tercera agrupación racial (7,6%) del total nacional, con una amplia distribución que abarca la mayoría de las provincias (Lynch *et al.*, 2009).

Los primeros ovinos ingresaron a América en el segundo viaje de Colón, procedentes de Andalucía y probablemente también de Canarias. Estas poblaciones no eran razas definidas ni estaban identificadas como se lleva a cabo hoy en día. De ellas, sólo se describía su ubicación geográfica o excepcionalmente el color (Rodero *et al.*, 1992). Posteriormente, en 1535 Mendoza y Ayolas introducen ovinos en Argentina directamente desde Sevilla y en 1548 Nuflo de Chavez ingresa ovejas y cabras desde el Perú (Rodero *et al.*, 1992; Giberti, 1970). Más tarde continuaron ingresando ovinos al territorio nacional, principalmente por Perú, y se diseminaron entre las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Corrientes (Zeballos, 1898). Por lo tanto, se debe considerar que los ovinos criollos son los descendientes directos de aquellos animales que ingresaron con los colonizadores españoles. En su evolución histórica han tenido una primera etapa de gran crecimiento y dispersión hasta principios del siglo XIX. En el año 1825, comienzan a introducirse en el país diferentes razas australianas, españolas e inglesas con el propósito de mejorar la producción lanera nacional, por lo que en Buenos Aires comienzan los primeros cruzamientos con merinos puros importados (Zeballos, 1898). Este hecho se da por la demanda de lanas finas para satisfacer las industrias europeas durante las décadas de 1830 y 1840 (Carrazzoni, 1997). Este proceso de mestización se intensificó con el tiempo, principalmente en las majadas más numerosas, siendo absorbido paulatinamente el ovino criollo por las razas introducidas. A partir de 1880, las ovejas entraron en la Patagonia por el sur llevadas por súbditos británicos que en su mayor parte eran de origen escocés, y más al norte, en la llanura pampeana, las ovejas fueron difundidas por colonos irlandeses a partir de 1840 (Coronato, 2010). Además, de forma concomitante a su absorción genética, los ovinos criollos han sido objeto de calificativos prejuiciosos que menoscabaron su verdadera potencialidad productiva (Martínez, 2015). Sin embargo, debido a su adaptación a los distintos ambientes de

nuestro país y a las ventajas productivas valoradas por los pequeños y medianos productores locales, el ovino criollo actualmente está siendo revalorizado en diversas regiones, como por ejemplo en la Patagonia (Lanari *et al.*, 2012), el oeste formoseño (De la Rosa *et al.*, 2012) y Córdoba (De Gea y Levrino, 2000), aunque todavía la información existente sobre este importante recurso animal es muy limitada (Mueller, 2005).

Los marcadores genéticos de tipo microsatélites han sido de gran utilidad para la caracterización genética de razas ovinas debido a su alto nivel de polimorfismo, su amplia distribución en el genoma, y por el hecho de contar con paneles de marcadores estandarizados (Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012; Agaviezor *et al.*, 2012). También, permiten analizar las relaciones genéticas entre poblaciones (Peter *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2012; Kijas *et al.*, 2012). Por su parte, el ADN mitocondrial (ADNmt) es utilizado para el análisis de los linajes maternos, dado que se transmite a la progenie a través de la madre (San Primitivo *et al.*, 2007). Además, no presenta recombinación y tiene una tasa de mutación elevada y relativamente constante. Actualmente cinco haplogrupos mitocondriales han sido descritos en el ovino doméstico (*Ovis aries*), los que han sido denominados como A, B, C, D y E (Meadows *et al.*, 2007). A pesar que estos dos tipos de marcadores genéticos han sido empleados para caracterizar numerosas razas ovinas, hasta la actualidad, no han sido empleados para el estudio de poblaciones criollas de Argentina. El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar genéticamente cuatro poblaciones de ovinos criollos ubicadas en distintas regiones geográficas de Argentina, utilizando un panel de 30 microsatélites y la región *D-loop* del ADNmt. La realización de este estudio permitirá contar con información para establecer criterios de manejo genético de este valioso recurso animal, aportando al diseño de estrategias en la elaboración de planes de conservación, recuperación y/o mejora de las poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Los ovinos criollos en Argentina no cuentan en la actualidad con registros genealógicos formales, ni con una asociación de criadores que avale o certifique la pertenencia de los animales a ésta agrupación racial. Es por esta razón que en el presente estudio se establecieron los siguientes criterios de

muestreo: i- la información proporcionada por sus criadores; ii- el aislamiento reproductivo (disminuye la probabilidad de mestización); y iii- el tamaño de la majada (permite un muestreo más representativo). La información de los criadores fue la principal herramienta en la definición y elección de las poblaciones a estudiar. Ellos han brindado el origen y la historia evolutiva de sus majadas e identificado los animales con las características fenotípicas correspondientes a las ovejas criollas. Los motivos de descarte para la conformación de los grupos de estudio fueron principalmente: a) introducción a la majada de algún reproductor de otra raza; b) la ausencia en la majada de carneros criollos; c) desconocimiento por parte del criador del origen de la majada. Por sus antecedentes, características reproductivas y diversidad de ambientes, se seleccionaron majadas localizadas en cuatro provincias: Salta (SA) con tres majadas, ubicadas en las localidades de Iruya y Pueblo Viejo ($22^{\circ}47'27''$ S, $65^{\circ}13'7''$ O), pertenecientes a familias de pueblos originarios collas (2.800 msnm); Santiago del Estero (SE), con tres majadas de pequeños productores ubicados en el Departamento Figueroa ($27^{\circ}42'32''$ S, $63^{\circ}46'25''$ O); Corrientes (CO), con una majada de aproximadamente 200 ovejas de un núcleo cerrado y mantenido como reserva por un criador de la zona de Sauce ($30^{\circ}5'9''$ S, $58^{\circ}47'14''$ O) y Buenos Aires (BA) con una majada numerosa (aproximadamente 800 ovejas) que se mantienen en núcleo cerrado en la localidad de 25 de Mayo, en la estancia La Juanita ($35^{\circ}25'00''$ S, $60^{\circ}10'00''$ O).

En total, se tomaron ciento veinte muestras de sangre entera de ovejas criollas adultas (4 a 6 dientes según cronometría dentaria), que no compartían madre entre ellas, a las que se les adicionó anticoagulante. De cada una de las poblaciones mencionadas se analizaron 30 muestras.

Análisis molecular

Para el análisis de los microsatélites se extrajo el ADN de las muestras de sangre utilizando el kit ADN *Gen Elute Kit Genomic Blood* (Sigma Aldrich). La caracterización genética a nivel autosómico se realizó utilizando el panel de 30 microsatélites recomendado por la FAO para realizar estudios de variabilidad genética en ovinos (<http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>). Dicho panel incluye los siguientes marcadores: BM1824, BM6506, BM6526, CSRD247, CSSM66, D5S2, ETH010, ETH225, HSC, ILST011, INRA35, INRA63, MA065, MAF209, MAF214, McM527, OarAE0129, OarCP20, OarCP34, OarCP49, OarFCB011, OarFCB020, OarFCB048, OarFCB304, RM006, SPS113, SPS115, TGLA053, TGLA122 y TGLA126.

Los productos de amplificación generados por la PCR, fueron analizados mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La asignación de los genotipos para los diferentes microsatélites se llevó a cabo utilizando el programa Gene Mapper versión 4.0 (Applied Biosystems) y el marcador interno LIZ 500 (500 pb). La genotipificación de los microsatélites se realizó en el laboratorio de genética molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, España.

Para el análisis de los matrilineajes se utilizó la región control del *D-loop* mitocondrial de 15 muestras de cada población de forma aleatoria. La extracción de ADN se realizó por el método orgánico a partir de las muestras de sangre, y los amplicones se obtuvieron utilizando los cebadores externos reportados por Hiendleder *et al.* (1998). Para la reacción de amplificación se emplearon los cebadores internos directos y reversos BGD y H3C (Pedrosa *et al.*, 2006).

Análisis poblacional

A partir de los genotipos se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética en la totalidad de los *loci* microsatélites: Número de alelos totales (N_{at}), Número de alelos por locus para cada población (N_p), Número de alelos efectivos (A_e), Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), el Contenido de Información Polimórfica (PIC) para cada marcador se estimó con el programa Excel Microsatellite Toolkit V3.1.1 (Park, 2001).

Las desviaciones del equilibrio Hardy Weinberg (HW) se estimaron utilizando las pruebas exactas que emplean Montecarlo vía cadenas de Markov, incluidas en el programa estadístico Genepop 4.2 (Rousset, 2008). La estructura de las poblaciones se estudió por los estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) según lo propuesto por Weir y Cockerham (1984). La estructura de la población y el grado de mezcla se estimaron mediante el modelo de agrupación Bayesiano del programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Según lo sugerido por varios autores, el análisis incluyó un modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas (Pritchard *et al.*, 2000; Zuccaro *et al.*, 2008). El número más probable de agrupaciones o K poblaciones presentes en el conjunto de datos se calculó con el algoritmo ΔK propuesto por Evanno *et al.* (2005). Para establecer gráficamente las relaciones genéticas entre las poblaciones se empleó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), que permitió clasificar los 120

individuos pertenecientes a las 4 poblaciones a través de la totalidad de los alelos de los diferentes loci estudiados. El AFC se realizó mediante el *software* Genetix (Belkhir *et al.*, 2004). Para estudiar la estructura genética poblacional, se aplicó el análisis molecular de la varianza (AMOVA), utilizando el programa Arlequin, versión 2000 (Schneider *et al.*, 2000). En organismos diploides la información de cada genotipo consiste en dos alelos por locus, consecuentemente, durante la construcción de la matriz de datos moleculares cada genotipo posee dos filas (una para cada alelo), por lo tanto, el número de datos se duplica (2N). La Suma de Cuadrados (SC) total fue particionada en “SC entre Poblaciones” y “SC dentro de poblaciones” con los grados de libertad P-1 y 2N-P respectivamente, siendo P: número total de poblaciones y N: número total de individuos. Las varianzas para cada fuente de variación fueron estimadas a partir de las esperanzas matemáticas de los CM, y sus porcentajes relativos se calcularon dividiendo cada una de ellas por la varianza total. Para estimar el nivel de significancia se usaron permutaciones aleatorias (10.000) de los genotipos entre las muestras (*Jackknifing*) (Excoffier *et al.*, 1990). Para el análisis de las secuencias obtenidas del D-loop mitocondrial se utilizó el programa Chromas Pro. El análisis de similitud se realizó mediante los programas CLUSTALW2 y ARLEQUIN, incluyendo en este análisis los haplogrupos nodales ovinos relacionados con el origen de los ovinos que ingresaron al continente americano (A, B y C).

RESULTADOS

Variabilidad de la población

En la población total de ovinos criollos analizada se detectó un total de 294 variantes alélicas en los treinta marcadores microsatélites tipificados. La población con mayor número de alelos (Na) fue CO= 226, la menor BA= 172 e intermedias SA= 201 y SE= 185. La media general de alelos por locus (Nam) fue de 9,8; mientras que el Nam por población siempre registró valores inferiores a la media general: CO= 7,53; SA= 6,70; SE= 6,16 y BA= 5,73. Esta particularidad puede explicarse porque todas las poblaciones presentaron alelos privativos o únicos (Ap), en el siguiente orden CO= 31; SA= 15; BA= 14 y SE= 9. También CO mostró el mayor número de alelos efectivos (Ae) (CO= 4,078; SA= 4,036; SE= 3,856 y BA= 3,193). El microsatélite ETH010 fue el que presentó el menor número de alelos (Na= 3)

en el total de las poblaciones, mientras que el marcador OarCP49 presentó el mayor número de variantes (Na= 21). BA mostró todos los alelos presentes en los loci BM1824 (Na= 5), ETH10 (Na= 3) y OarAE0129 (Na= 7), CO tuvo todos los alelos presentes en los loci BM1824 (Na= 5), D5S2 (Na= 5) y McM527 (Na= 7), SE mostró todos los alelos presentes de BM1824 (Na= 5) y SA no presentó la totalidad de los alelos en ninguno de los marcadores analizados.

La Tabla 1, muestra la Heterocigosidad Observada (Ho), la Heterocigosidad Esperada (He) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) por *loci* y por población. De los 30 marcadores microsatélites tipificados, 24 presentaron valores mayores a 0,50 mostrando la utilidad de los mismos para analizar diversidad genética, ya que son altamente informativos. El marcador con mayor contenido de información polimórfica fue el TGLA053 (PIC= 0,877) y los de menor valor ETH010 (PIC= 0,148) y MAF214 (PIC= 0,444). Los valores encontrados de Ho variaron entre 0,067 para el marcador ETH010 en CO y 0,967 para los marcadores McM527 y OarFCB048 en CO y SA, respectivamente. En el caso de la He, los valores obtenidos oscilaron entre 0,064 para el marcador ETH010 en CO y 0,88 para el marcador OarCP49 en SE.

Todas la poblaciones presentaron loci con desequilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) ($p < 0,05$): BA= 2 (OarCP20; OarFCB304), SE= 6 (OarAE0129; OarCP20; TGLA126; ILSTS01; INRA35; SPS115) y las de mayor número fueron CO y SA= 9 (CSR0247; CSSM66; ETH225; OarAE0129; OarCP20; OarFCB011; OarFCB048; SPS113; TGLA126) y (CSSM66; OarAE0129; OarFCB011; TGLA126; BM1824; BM6506; BM6526; CSR0247; OarFCB304), respectivamente. Ningún marcador presentó desequilibrio simultáneamente en las cuatro poblaciones. El valor de Fis multilocus (índice de fijación de Wright), que describe el déficit de heterocigotas de la población, fue de 0,0305 (desde -0,008 hasta 0,069), valor bajo y con un intervalo que incluye el cero, lo que indica que en promedio la distribución de los genotipos no se aleja del equilibrio H-W. La población con mayor diversidad genética resultó CO, presentando mayor heterocigosidad y menor valor Fis, en segundo lugar se ubicó SA, mientras que SE y BA presentaron menores valores de heterocigosidad y mayores valores de Fis, lo que indicaría una menor variabilidad genética, debido quizás a un incremento de la homocigosidad por fijación de alelos o endogamia. Sin embargo, los FIS calculados para las poblaciones estudiadas pueden ser considerados bajos en general (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros poblacionales para cada microsatélite.

Locus	PIC	Población							
		CO		SE		SA		BA	
		Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
BM1824	0,719	0,724	0,738	0,68	0,753	0,5	0,626	0,552	0,688
BM6506	0,674	0,667	0,701	0,621	0,625	0,633	0,746	0,714	0,625
BM6526	0,727	0,8	0,757	0,7	0,674	0,7	0,566	0,767	0,766
CSRD247	0,707	0,5	0,731	0,75	0,751	0,64	0,671	0,69	0,656
CSSM66	0,847	0,931	0,876	0,667	0,713	0,586	0,807	0,759	0,764
D5S2	0,633	0,75	0,678	0,63	0,698	0,643	0,621	0,633	0,61
ETH010	0,149	0,067	0,064	0,167	0,153	0,133	0,124	0,3	0,265
ETH225	0,528	0,567	0,525	0,379	0,432	0,759	0,708	0,567	0,527
HSC	0,832	0,852	0,805	0,786	0,768	0,852	0,849	0,793	0,732
ILSTS01	0,698	0,619	0,642	0,714	0,729	0,704	0,75	0,643	0,719
INRA35	0,791	0,867	0,797	0,667	0,796	0,862	0,754	0,759	0,651
INRA63	0,747	0,733	0,743	0,481	0,607	0,962	0,804	0,821	0,652
MA065	0,74	0,767	0,716	0,731	0,73	0,933	0,667	0,733	0,777
MAF209	0,769	0,759	0,699	0,759	0,744	0,929	0,78	0,69	0,76
MAF214	0,444	0,5	0,471	0,433	0,391	0,467	0,562	0,3	0,263
McM527	0,731	0,967	0,824	0,867	0,802	0,8	0,651	0,733	0,563
OarAE0129	0,652	0,533	0,614	0,19	0,499	0,379	0,551	0,667	0,688
OarCP20	0,711	0,448	0,69	0,5	0,774	0,633	0,669	0,12	0,254
OarCP34	0,642	0,7	0,654	0,621	0,64	0,759	0,735	0,567	0,641
OarCP49	0,873	0,867	0,874	0,897	0,88	0,828	0,872	0,655	0,763
OarFCB011	0,758	0,931	0,766	0,833	0,778	0,767	0,768	0,517	0,561
OarFCB020	0,81	0,867	0,86	0,667	0,624	0,926	0,818	0,724	0,757
OarFCB048	0,77	0,833	0,719	0,759	0,674	0,967	0,832	0,8	0,814
OarFCB304	0,837	0,733	0,725	0,862	0,851	0,897	0,832	0,643	0,661
RM006	0,637	0,679	0,67	0,63	0,627	0,69	0,646	0,552	0,546
SPS113	0,703	0,633	0,709	0,7	0,628	0,786	0,753	0,7	0,705
SPS115	0,772	0,931	0,814	0,833	0,788	0,769	0,765	0,759	0,765
TGLA053	0,878	0,821	0,807	0,897	0,878	0,867	0,873	0,821	0,793
TGLA122	0,758	0,759	0,822	0,5	0,692	0,417	0,614	0,5	0,556
TGLA126	0,853	0,633	0,747	0,52	0,845	0,462	0,76	0,517	0,747

PIC: Contenido de Información Polimórfica; H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

Tabla 2. Indicadores de diversidad genética por población.

Población	H _e	H _o	F _{is}
CO	0,715	0,708	0,00835 (-0,05573 – 0,04374)
SE	0,648	0,685	0,07264 (0,01056 – 0,10591)
SA	0,708	0,706	0,01470 (-0,03601 – 0,05084)
BA	0,633	0,642	0,03180 (-0,02844 – 0,05222)
Promedio	0,676	0,685	0,03048 (-0,00782 – 0,06862)

H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

Estructuración Poblacional

Para estimar la distancia entre las poblaciones se construyó la matriz de distancias genéticas entre las cuatro poblaciones, utilizando el parámetro FST (Tabla 3). Las poblaciones CO y SE fueron las que presentaron menor distancia genética (0,033), mientras que las más alejadas fueron BA y SE (0,104) y BA con SA (0,098). BA fue la población más diferente del resto de las regiones. En concordancia con la matriz de distancias genéticas, el AFC permitió identificar a las poblaciones más distanciadas del centro de coordenadas del *biplot* como las más divergentes. Además, el *biplot*, construido con el primer y segundo eje, explicó un alto porcentaje de la variabilidad total (75%). La Figura 1, muestra a CO y SE como las más próximas entre sí, mientras que BA y SA se mantuvieron como grupos separados. El *biplot* demostró la existencia de un arreglo poblacional particular, los individuos pertenecientes a una población siempre se agruparon juntos y no se mezclaron con individuos de otra población, a excepción de las poblaciones CO y SE, cuyos individuos se solaparon (Figura 1). Por lo tanto, se pudo comprobar gráficamente la existencia de 3 grupos; CO+SE (Centro), SA (Norte) y BA (Sur).

Por otra parte, la aplicación del modelo bayesiano, de acuerdo al método propuesto por Evanno *et al.* (2005) reveló un número esperado de *clusters* (K) entre 1 y 6. En este análisis se asumió que K= 4, ya que resultó ser el número de poblaciones que se diferenciaron en función de la variabilidad genética encontrada (Figura 2). La población de Buenos Aires resultó ser la más distante de acuerdo a su

composición genética en relación con las otras poblaciones analizadas. Al aumentar el K, se fue diferenciando primero con la población Salteña y subsiguientemente con las poblaciones de Corrientes y Santiago del Estero.

Para definir la estructura poblacional, se utilizaron dos análisis moleculares de la varianza (AMOVAS). El primero, consideró las cuatro poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y se estimó particionando la diversidad genética total en “SC entre poblaciones” y “Suma de Cuadrados dentro de poblaciones”. Posteriormente, se computó un segundo AMOVA, estructurando los datos en función del AFC, el número de *clusters* esperado y la matriz de distancia genética (FST). Entonces se consideraron tres grupos de poblaciones o Regiones: 1- Buenos Aires (Sur); 2- Salta (Norte); 3- Corrientes + Santiago del Estero (Centro). En el modelo jerárquico, la “SC entre poblaciones” considerada en el primer modelo se particionó en: “SC entre Regiones” y “SC entre Poblaciones dentro de Regiones” (Schneider *et al.*, 2000). El AMOVA (sin estructura) mostró diferencias significativas entre las cuatro poblaciones. Sin embargo, el porcentaje de variación que explicó dicha fuente fue sólo del 7,6%, mientras que la mayor variabilidad se expresó “dentro de poblaciones” con un porcentaje del 92,5% (Tabla 4-a). El AMOVA (con estructura) mostró diferencias significativas entre grupos (regiones) y dentro de poblaciones, pero las poblaciones dentro de los grupos no fueron diferentes, señalando que Corrientes y Santiago pueden ser consideradas integrantes de una misma población (Centro). La máxima variabilidad

también fue explicada por la fuente de variación “dentro de poblaciones” (Tabla 4-b).

Análisis de los Linajes Maternos

En el caso del análisis del D-loop mitocondrial, las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos públicas de secuencias nucleotídicas utilizando el algoritmo BLAST. Esto permitió determinar su identidad con los haplotipos ovinos previamente reportados para el D-loop mitocondrial. Posteriormente, se realizó el

alineamiento de las secuencias empleando el programa DNAMAN versión 5.2.10 (Lynnon BioSoft, Quebec, Canadá) y se completó el análisis con las secuencias consensos representativos de los haplogrupos A, B y C. Estos haplogrupos se diferencian entre sí en siete sitios polimórficos (Tabla 5). Las muestras analizadas pertenecen al haplogrupo A, de origen asiático. Por su parte, durante el análisis de las secuencias propias se encontró un sitio polimórfico nuevo que se presentó en el 68% de los animales analizados.

Tabla 3. Matriz de distancia genética entre las poblaciones utilizando el método de diferentes alelos (Fst).

	CO	SE	SA	BA
CO	0,00000			
SE	0,03273	0,00000		
SA	0,06493	0,07156	0,00000	
BA	0,07989	0,10414	0,09821	0,00000

PIC: Contenido de Información Polimórfica; H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

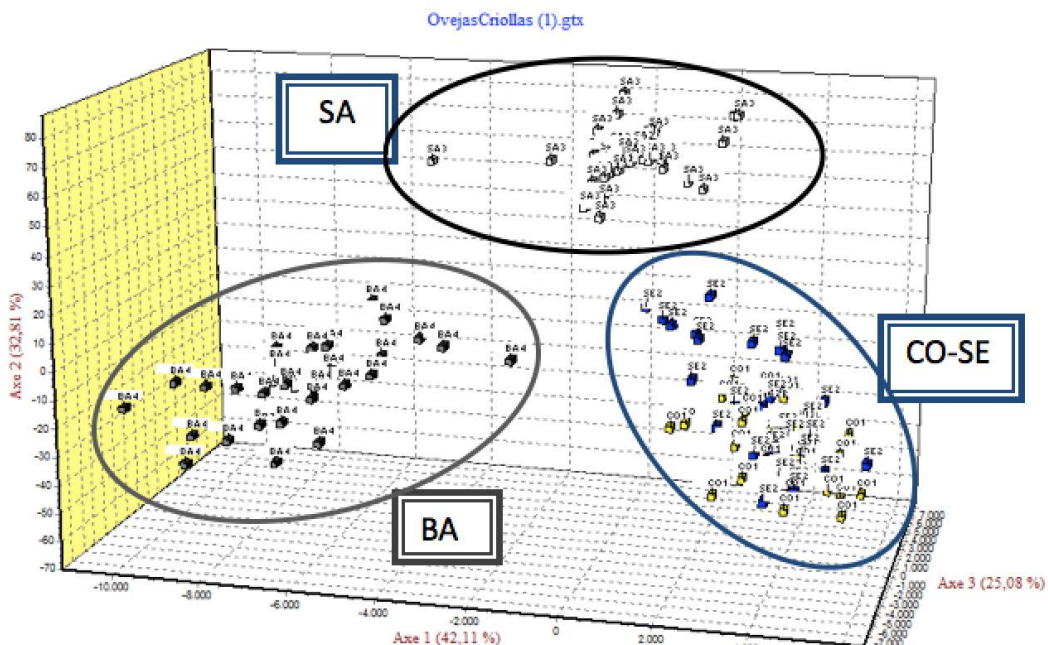


Figura 1. Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples (AFC) entre los individuos de las diferentes poblaciones (CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires).

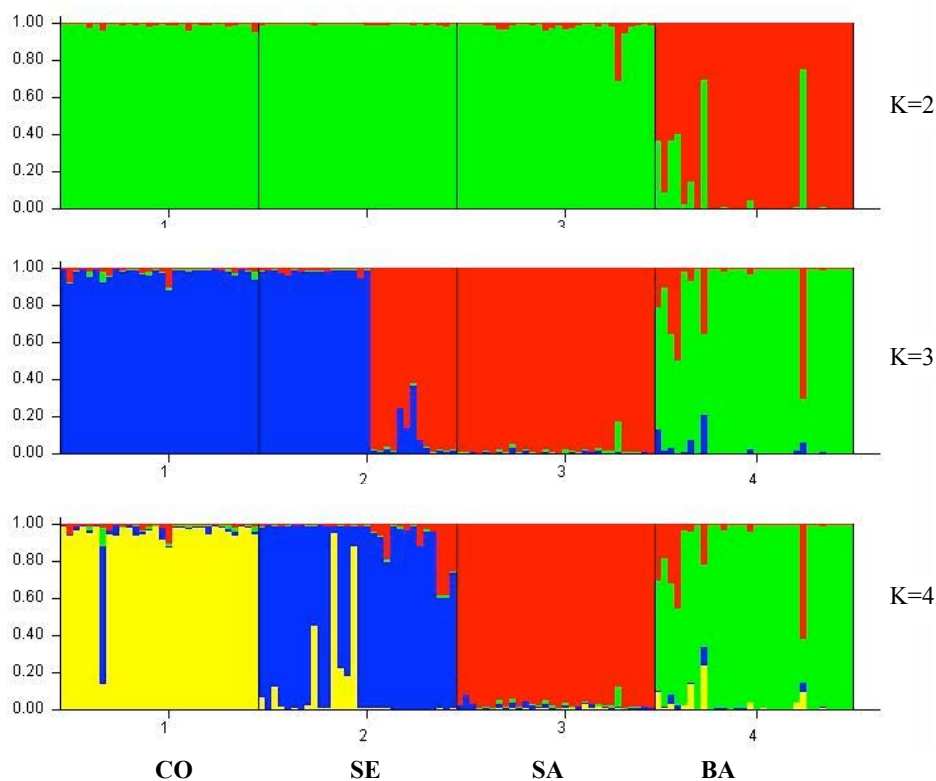


Figura 2. Estructura poblacional analizada por STRUCTURE para las poblaciones. (CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires) con los valores de K= 2, 3 y 4.

Tabla 4. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA); a- Análisis sin estructura poblacional; b- Análisis con estructura poblacional.

Fuentes de variación	gl ⁽¹⁾	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	p ⁽²⁾	Porcentaje de variación
a					
Entre poblaciones	3	105,71	0,49 (Va)	<0,01	7,55
Dentro de poblaciones	236	1.411,05	5,98 (Vc)		92,45
Total	239	1.516,82	6,47 (Vt)		
b					
Entre regiones (Norte-Centro y Sur)	2	87,48	0,98 (Va)	<0,01	5,2
Entre poblaciones dentro de regiones	1	18,3	0,32 (Vb)	0,16	3,15
Dentro de Poblaciones	236	1.411,05	10,16 (Vc)	<0,01	91,65
Total	239	1.516,82	11,46 (Vt)		

⁽¹⁾Grados de libertad; ⁽²⁾Nivel de probabilidad; (Va): Varianza debida a diferencias entre genotipos de diferentes poblaciones; (Vb): Varianza debida a diferencias entre genotipos de diferentes poblaciones dentro de una región; (Vc): Varianza debido a diferencias entre genotipos dentro de una población; (Vt): Varianza molecular total.

Tabla 5. Sitios polimórficos que permiten analizar los Haplogrupos A, B y C, como los sitios analizados en las poblaciones locales.

HAPLOGRUPO/ POBLACIÓN	POSICIÓN							
	16250	16258	16285	16471	16482	16495	16576	16646
Haplogrupo A	C	C	A	C	G	G	C	C
Haplogrupo B	T	T	A	C	A	A	C	T
Haplogrupo C	T	T	A	T	A	A	T	T
Poblaciones Locales	C	C	G	C	G	G	C	C
Poblaciones Locales	C	C	A	C	G	G	C	C

DISCUSIÓN

Considerando que se han estudiado cuatro poblaciones pertenecientes a una sola agrupación racial, involucrando en total a 120 individuos (30 por población), el número total de alelos encontrado ha sido relativamente alto (294). Esto estaría indicando que a pesar de la reducción en el número de ovinos criollos, éstos aún conservan un alto grado de variabilidad, lo cual puede dimensionarse adecuadamente si observamos que en un estudio sobre 1675 ovejas pertenecientes a 52 razas del norte de Eurasia se describieron en total 342 variantes alélicas (Tapio *et al.*, 2010). Para la caracterización molecular hemos utilizado un elevado número de microsatélites (30) si se compara con otros trabajos que utilizaron 11 y 12 marcadores para caracterizar 11 razas ovinas de Colombia y seis razas Pireánicas, respectivamente (Ocampo *et al.*, 2016; Ferrando *et al.*, 2014). El rango encontrado de alelos por marcador fue de 3 a 21, el primero asociado al microsatélite ETH010 y el segundo a OarCP49. Para ETH010 se han reportado un mayor número de variantes, como por ejemplo en las razas ovinas de las Islas Baleares donde fueron descritas siete (Pons *et al.*, 2015). El número de variantes encontradas para OarCP49 coincidió con el número reportado para el ovino criollo Pantaneiro (Crispim *et al.*, 2014) y ambos se diferenciaron de la raza ovina Xisqueta donde el número de variantes para este marcador fue sustancialmente menor ($N_a = 8$) (Avellanet Torres, 2006). El número medio de alelos y la heterocigosidad son los parámetros más usuales

en la evaluación de la diversidad genética. El número medio de alelos en la población total ($N_{am} = 9,8$) puede considerarse alto si lo comparamos con los resultados obtenidos para 11 razas ovinas austríacas que mostraron los siguientes valores: Alpines Steinschaf= 9,43; Texel= 6,19; Montafoner Steinschaf= 7,10; Krainer Steinschaf= 7,38; Kärntner Brillenschaf= 8,71; Waldschaf= 10,71; Zackelschaf= 7,81; Tiroler Steinschaf= 6,19; Braunes Bergschaf= 8,62; Tiroler Bergschaf= 7,95; y Juraschaf= 7,57 (Baumung *et al.*, 2006). La población CO resultó la más diversa debido a que registró mayor número de alelos ($N_a = 226$), con mayor número de alelos privativos ($A_p = 31$), mayor heterocigosidad ($H_e = 0,715$) y menor endogamia ($F_{IS} = 0,008$). La población SA también resultó tener alta variabilidad genética, mientras que BA resultó ser la población menos diversa con $N_a = 172$, $A_p = 14$ y $H_e = 0,633$. La matriz de distancia genética demostró que los grupos más alejados entre sí fueron SE y BA ($F_{ST} = 0,10414$) y en segundo lugar SA y BA ($F_{ST} = 0,098$), mientras que los grupos más parecidos entre sí fueron SE y CO ($F_{ST} = 0,033$). Coincidentemente con la matriz de distancia, el AFC definió tres grupos de individuos: SA (Norte), BA (Sur) y CO+SE (Centro), ubicando a las poblaciones BA y SE en los extremos opuestos del primer eje del *biplot* (que explica el mayor porcentaje de inercia total), permitiendo inferir que ambas poblaciones son las que más divergen en sus frecuencias alélicas. La población SA se halla alejada de las restantes poblaciones sobre el segundo componente, esto podría explicarse por su estructura y diversidad

diferencial relacionada a una variabilidad genética media, un índice de diversidad alto y la existencia de un exceso o déficit de heterocigotas especialmente en aquellos *loci* que presentaron ausencia de desequilibrio en las otras poblaciones. Sin embargo, las divergencias entre regiones podrían atribuirse a que las poblaciones se encuentran adaptadas a ambientes particulares. Esto explicaría porque a distancias mayores se observaron mayores diferencias genéticas, siendo una de las posibles causas una reducción en el flujo génico (Wright, 1943). Aunque los marcadores utilizados son de naturaleza neutral, las variantes únicas encontradas en cada población podrían estar asociadas a variaciones funcionales que podrán explorarse en el futuro.

Sin embargo, debe destacarse que la diversidad alélica total del ovino criollo está particionada entre las diferentes regiones geográficas, variando el N_{am} entre 5,7 en BA y 7,5 en CO, observándose un considerable número de alelos privados (A_p) dentro de cada población. No obstante, estos valores son similares a los registrados en distintas razas como por ejemplo las italianas Cornigliese= 6,64 y Bergamasca= 5,56 o la Merino española= 7,41 (Ceccobelli *et al.*, 2015). La heterocigosidad esperada (H_e) es considerada como el mejor estimador de la diversidad genética en una población (Kim *et al.*, 2002). Los valores de heterocigosidad media esperada en cada población variaron entre 0,63 BA y 0,715 en CO, indicando alta diversidad genética con similares valores a los obtenidos en diez razas de las islas Baleares (rango de 0,62 para la Ibicenca a 0,75 para la Churra) (Pons *et al.*, 2015). Ambos AMOVAS, con y sin estructura poblacional, evidenciaron que la mayor parte de la variación genética total correspondió a diferencias entre individuos (con 91,6 y 92,4%, respectivamente), mientras que las diferencias entre poblaciones explicó poco de la variabilidad total (7,6 y 5,2%, respectivamente). Este grado de diferenciación genética entre las poblaciones fue mayor que el observado en los ovinos criollos colombianos donde la variación genética entre las poblaciones resultó ser de 3,8% (Ascue Vivas, 2013) o entre 13 razas ovinas en Colombia donde las diferencias entre las razas explicaron el 4% de la variación total (Campos *et al.*, 2016). Por otra parte, el análisis del D-loop mitocondrial puso en evidencia que los sitios polimórficos hallados son compartidos con el haplogrupo A (asiático). Esto puede deberse a que este haplogrupo se encuentra presente en varias razas españolas actuales (Pedrosa *et al.*, 2006; Ferrando *et al.*, 2009), cuyos antecesores podrían ser compartidos con los ovinos criollos de nuestro país. La homogeneidad de los ovinos

criollos, manifestada a través del ADN mitocondrial es mayor que la hallada con los microsatélites. Además, es de destacar que las secuencias obtenidas presentaban sitios polimórficos que sólo se presentan con una alta frecuencia en las poblaciones locales. Los resultados obtenidos con diferentes análisis estadísticos (AMOVA y AFC) y los parámetros estudiados (FST, K, Nm, etc.) confirman que la máxima variabilidad genética es explicada por diferencias en los patrones moleculares de los individuos, señalando una alta variación intrapoblacional. Por otro lado, los bajos porcentajes de variación encontrados para las fuentes “Entre poblaciones” y “Entre grupos (Regiones)” presentadas en los AMOVAS con y sin estructura, respectivamente, confirman los resultados encontrados mediante el análisis del ADN mitocondrial. Ello revela cierta homogeneidad entre las poblaciones estudiadas ratificando la pertenencia a la misma agrupación racial. En conclusión, el presente estudio ha contribuido al conocimiento de los ovinos criollos argentinos, destacando la diversidad genética de los mismos y brindando información sobre su estructura poblacional, lo que permitirá encarar diferentes estrategias a la hora de implementar planes de conservación, recuperación y/o mejora, de este valioso recurso genético, según requiera la situación local.

BIBLIOGRAFÍA

- Agaviezor B.O., Peters S.O., Adefenwa M.A., Yakubu A., Adebambo O.A., Ozoje M.O., Ikeobi C.O., Wheto M., Ajayi O.O., Amusan S.A., Ekundayo O.J., Sanni T.M., Okpeku M., Onasanya G.O., Donato M.D., Ilori B.M., Kizilkaya K., Imumorin I.G. (2012) Morphological and microsatellite DNA diversity of Nigerian indigenous sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 3: 38.
- Álvarez I., Capote J., Traoré A., Fonseca N., Pérez K., Cuervo M., Fernández I., Goyache F. (2012) Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Ruminant Research* 104: 89-93.
- Ascue Vivas N.J. (2013) Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordinación general de posgrados Sede Palmira.

- Avellanet Torres Rosa (2006) Conservación de recursos genéticos ovinos en la raza Xisqueta: Caracterización estructural, racial y gestión de la diversidad en programas “in situ”. Tesis doctoral Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Baumung R., Cubric-Curik V., SchwendK., Achmann R., Solkner J. (2006) Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: 265-271.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Calvo J.H., Alvarez-Rodríguez J., Marcos-Carcavilla A., Serrano M., Sanz A. (2011) Genetic diversity in the Churratensina and Churralebrijana endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small Ruminant Research* 95: 34-39.
- Campos R., Cardona H., Martínez R. (2016) Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76 (1): 40-46.
- Carrazoni J.A. (1997) Crónicas del Campo Argentino, nuestras raíces agropecuarias. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Orientación Gráfica Editora SRL, pp. 405.
- Ceccobelli S., Karsli T., Di Lorenzo P., Marozzi G., Landi V., Sarti F.M., Sabbioni A., Lasagna E. (2015) Genetic diversity of Cornigliese sheep breed using STR markers. *Small Ruminant Research* 123: 62-69.
- Coronato F. (2010) Le role de l'élevage ovin dans la construction du territoire de la Patagonie. Autre [q-bio. OT]. *AgroParisTech*, Français. NNT: 2010AGPT pastel-<00593011>.
- Crispim B., Seno de Oliveira L., Alves do Egito A., Miranda de Vargas F., Barufatti Grisolia A. (2014) Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of Pantaneiro sheep. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 317-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.007>.
- De Gea G.A., Levrino G. (2000) La oveja tipo “Criollo” de las Sierras de Los Comechingones. XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), Córdoba, Argentina.
- De la Rosa S.A., Revidatti M.A., Tejerina E.R., Orga A., Capello J.S., Petrina J.F. (2012) Estudio para la caracterización de la oveja criolla en la región semiárida de Formosa, Argentina. *Revista AICA* 2: 87-94.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (1990) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1 (2005): 47-50.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14 (8): 2611-20.
- Ferrando A., Casas M., Marmi J., Parés P.M., Jordana J. (2009) Variabilidad del ADN mitocondrial en cinco razas ovinas pirenaicas. *AIDA XIII Jornadas Españolas sobre Producción Animal*, Tomo I: 48-50.
- Ferrando A., Goyache F., Parés P.M., Carrión C., Miró J., Jordana J. (2014) Genetic relationships between six eastern Pyrenean sheep breeds assessed using microsatellites. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12 (4): 1029-1037.
- Giberti H. (1970) Historia económica de la ganadería argentina. Solar Hachette, Buenos Aires.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* 47 (4): 441-8.
- Kijas J.W., Lenstra J.A., Hayes B., Boitard S., Neto L.R.P., San Cristobal M., Servin B., McCulloch R., Whan V., Gietzen K., Paiva S., Barendse W., Ciani E., Raadsma H., McEwan J., Dalrymple B. (2012) Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels

- of historic mixture and strong recent selection. *PLOS Biology* 10: .
- Kim K.S., Yeo J.S., Choi C.B. (2002) Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics* 33 (3): 201-204.
- Lanari M.R., Reising C., Monzón M., Subiabre M., Killmeate R., Basualdo A., Cumilaf A.M., Zubizarreta J.L. (2012) Recuperación de la oveja Linca en la Patagonia Argentina. *Revista AICA* 2: 151-154.
- Lynch G., Peña S., Mc Cormick M., Simonetti L., Donzelli V., De Gea G., Lanari M., Martínez R. (2009) Recursos genéticos ovinos en la Argentina. En: Delgado Bermejo J.V. (Ed.) Biodiversidad ovina iberoamericana. Universidad de Córdoba, España, pp. 405-432.
- Martínez R.D. (2015) Prejuicios que afectan a bovinos y ovinos criollos en Argentina. *Revista AICA* 5: 26-35.
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J.W. (2007) Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics* 175: 1371-1379.
- Mueller J. (2005) Síntesis de las razas ovinas y su uso en la Argentina. Memorias del VII curso de actualización ovina. INTA Bariloche pp. 3-13. www.produccion-animal.com.ar (visitada el 11/11/13).
- Niu L.L., Li H.B., Ma Y.H., Du L.X. (2012) Genetic variability and individual assignment of Chinese indigenous sheep populations (*Ovis aries*) using microsatellites. *Animal Genetics* 43: 108-111.
- Ocampo R., Cardona H., Martínez R. (2016) Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76 (1): 40-47.
- Park S. (2001) Animal Genomics Lab. University College, Dublin, Ireland. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>. Excel Microsatellite Toolkit v. 3.1.
- Pedrosa S., Arranz J., Nuno B., Molina A., San Primitivo F., Bayón Y. (2006) Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet. Sel. Evol.* 39 (1): 91-103.
- Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38: 37-44.
- Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pons A.L., Landi V., Martínez A., Delgado J.V. (2015) The biodiversity and genetic structure of Balearic sheep breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* pp. 1-9.
- Rodero A., Delgado J.V., Rodero E. (1992) Primitive Andalusian Livestock and their implications in the discovery of America. *Arch. Zoot.* 41 (extra)(154): 383-400.
- Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- San Primitivo F., Pedrosa S., Arranz J.J., Brito N.V., Molina A., Bayón Y. (2007) Variabilidad del DNA mitocondrial en razas ovinas ibéricas. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1): 455-460.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) ARLEQUIN. Software for population genetics data analysis. University of Geneva, Switzerland, pp. 111.
- Tapio M., Ozerov M., Tapio I., Toro M.A.M., Marzanovs N., Cinkulov M., Goncharenko G., Kiselyova T., Murawski M., Kantanen J. (2010) Microsatellite-based genetic diversity and population structure of domestic sheep in northern Eurasia. *BMC Genetics*, 76: 1-11.
- Weir B.S., Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Zeballos E. (1898) Descripción Amena de la República Argentina. Tomo III "A través de las cabañas". Editor Jacobo Peuser, La Plata, Argentina.



Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S., Mitchell J.I. (2008) Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (4): 931-41.

OBITUARY

Dr. Eduardo Alberto Moscone

Río Cuarto, Pcia. de Córdoba 24/03/1953 – 9/04/2017



EDUARDO ALBERTO MOSCONE nació en Río Cuarto (Córdoba) el 24/03/1953 y falleció el 09/04/2017. Se recibió de Biólogo (1983) y de Doctor en Ciencias Biológicas (1990) en la Universidad Nacional de Córdoba.

Entre los años 1992 y 1994 realizó una estadía de investigación en el Instituto de Botánica (Viena, Austria), y luego entre 1995 y 1996 en el Instituto de Biología Molecular (Salzburgo, Austria). En el año 1994 también visitó el Department of Chromosome Biology (University of Viena, Austria), y realizó además estadías breves desde 1996 a 2003 en el Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Austrian Academy of Sciences (Viena, Austria).

Durante su estadía en el “Institute of Molecular Biology, Austrian Academy of Sciences (Salzburgo, Austria)” desarrolló junto a los Drs. A.J.M. Matzke y M.A. Matzke un método combinado de hibridación del DNA *in situ* (FISH/GISH) y tinción fluorescente con DAPI (Moscone et al., 1996. *Chromosoma* 105: 231-236). Dicho procedimiento fue instalado por el Dr. Moscone en 1996, en el “Department of Cytology and Genetics, Institute of Botany and Botanical Garden (University of Vienna, Austria)” a cargo del Prof. Dr. D. Schweizer y, en 1999, en el “Laboratório de Citogenética Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil)”, a cargo del Prof. M. Guerra. En ambos laboratorios capacitó al personal local y de otros centros de investigación.

Regresó a Argentina en el año 2000 para instalar su propio laboratorio de Citogenética Vegetal en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, Córdoba) y desarrollar de esta manera las técnicas y métodos traídos de Europa. En 2002, puso en funcionamiento la técnica de FISH, de manera conjunta entre el IMBIV y el IFFIVE-INTA (Córdoba), en colaboración con el Dr. Ducasse. También amplió una línea de investigación utilizando esta técnica con el Dr. Vilaro (Hospital Privado Universitario de Córdoba, Laboratorio de Microbiología) sobre identificación de bacterias patógenas en pacientes con sepsis.

Fue Investigador Independiente del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina) y Profesor Titular (SE) por concurso en la Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Universidad Nacional de Córdoba) desde junio de 2004. Además fue socio de la Sociedad Argentina de Genética desde octubre de 1984. Recibió premios y distinciones como el “Apoyo a Investigadores”, otorgado por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba, en abril de 1991. Cabe destacar que fue el único citogenetista del grupo de investigación de los Drs. M.A. Matzke y A.J.M. Matzke durante los años 1994 y 1996, quienes recibieron el “Wittgenstein Prize” (1997), máximo galardón otorgado por el gobierno de Austria a la investigación científica.

El Dr. Eduardo Moscone dedicó su vida a la investigación y al desarrollo de métodos de estudio de la citogenética en Solanáceas. Poseía un método minucioso y riguroso, que se aprecia en más de 40 trabajos publicados en importantes revistas científicas.

Este es el reconocimiento a nuestro amigo y colega, a un hombre generoso, a un gran científico y destacado CITOGENETISTA VEGETAL ARGENTINO.

Dr. Marcellino, Dr. Vilaro, Dr. Seijo, Dra. Acosta, Dra. Scaldaferrro, Dr. Daviña



BAG
Journal of Basic & Applied Genetics