

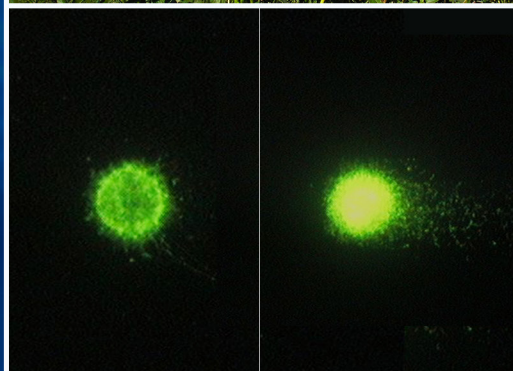


Journal of Basic & Applied Genetics (Formerly MENDELIANA)

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

Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX
THOMSON REUTERS
SCOPUS

Included in **SciELO**



BUENOS AIRES - ARGENTINA



COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

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

Editores Asociados:

Citogenética Animal

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

Citogenética Humana

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

Citogenética Vegetal

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

Genética de Poblaciones y Evolución

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

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

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

Genética Humana y Genética Médica

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

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

Genética Molecular (Animal)

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

Genética Molecular (Vegetal)

Dr. Alberto Acevedo
Centro de Investigación de Recursos Naturales,
INTA
Castelar, Argentina

Dr. Andrés Zambelli
Centro de Investigación en Biotecnología, ADVANTA
Semillas
Balcarce, Argentina

Genética y Mejoramiento Animal

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

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

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal

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

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

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

Mutagénesis

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

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal

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

Consultor Estadístico:

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

ÍNDICE

5 - 15

Article 1 - research

SELF-POLLINATION AND ITS IMPLICATION IN INVASIVENESS OF *Helianthus annuus* ssp. *annuus* AND *H. Petiolaris*

AUTOPOLINIZACIÓN Y SU IMPLICANCIA EN LA INVASIVIDAD DE *Helianthus annuus* ssp. *annuus* Y *H. Petiolaris*

Gutierrez A., Rueda F., Cantamutto M., Poverene M.

16 - 31

Article 2 - research

MORPHOLOGICAL PHENOTYPES, POLLEN VIABILITY AND POLLEN-PISTIL RELATIONS IN THREE NATURAL POPULATIONS OF THE WILD POTATO *Solanum chacoense* BITTER

FENOTIPOS MORFOLÓGICOS, VIABILIDAD DEL POLEN Y RELACIONES POLEN-PISTILO EN TRES POBLACIONES NATURALES DE LA PAPA SILVESTRE *Solanum chacoense* BITTER

Poulsen Hornum A., Camadro E.L.

32 - 41

Article 3 - research

PRINCIPAL COMPONENTS IN ASSOCIATIVE MAPPING

COMPONENTES PRINCIPALES EN MAPEO ASOCIATIVO

Peña Malavera A., Gutierrez L., Balzarini M.

41 - 52

Article 4 - research

ZINC SULFATE SUPPLEMENTATION OF CULTURED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES: GENOMIC INSTABILITY RELATED TO ITS DEFICIENCY AND EXCESS

SUPLEMENTACIÓN DE CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA CON SULFATO DE ZINC: INESTABILIDAD GENÓMICA ASOCIADA A SU DEFICIENCIA Y EXCESO

Padula G., Ponzinibbio M.V., Seoane A.I.

53 - 60

Article 5 - research

EFFECT OF WATERCRESS ON INDUCED DNA DAMAGE, DNA REPAIR AND P-GLYCOPROTEIN ACTIVITY IN HUMAN LYMPHOCYTES

EFFECTO DEL BERRO SOBRE EL DAÑO INDUCIDO AL ADN, LA REPARACIÓN DEL ADN Y LA ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA P EN LINFOCITOS HUMANO

Casanova N.A., Wagner M.L., López Nigro M.M., Carballo M.A.

61 - 63

Article 6 - cultivar registration

REGISTRO DE CULTIVAR CUMÉ-UNRC

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

64-67

Obituaries

KATSUO ARMANDO OKADA

Ing. Agr. ENRIQUE FRANCISCO ANTONELLI

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Tapa



Helianthus petiolaris en banquina de campo cultivado.

Autor: A. Gutiérrez



Ensayo cometa, análisis cualitativo (grados de daño 1 y 2), en linfocitos de sangre periférica humana.

Autor: G. Padula



Novillos Hereford

Autor: L. Melucci

SELF-POLLINATION AND ITS IMPLICATION IN INVASIVENESS OF *Helianthus annuus* ssp. *annuus* AND *H. Petiolaris*

AUTOPOLINIZACIÓN Y SU IMPLICANCIA EN LA INVASIVIDAD DE *Helianthus annuus* ssp. *annuus* Y *H. Petiolaris*

Gutierrez A.¹, Rueda F.², Cantamutto M.^{1,2}, Poverene M.^{1,2}

¹CERZOS-CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

²Department of Agronomy, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

aguti@criba.edu.ar

ABSTRACT

Helianthus petiolaris and *H. annuus* are exotic invaders that have spread widely in central Argentina in the last 70 years. As other annuals of the same genus, these species are outcrossers bearing a sporophytic self-incompatible mechanism. We investigated the ability to self-pollinate in plants of five accessions of each species, its influence on some reproductive traits, and compared to the cultivated sunflower, in which breeding for self-compatibility has been very successful. Plants were allowed to self-pollinate in bagged heads, manually forced to self-pollinate or allowed to cross-pollinate. Although both invasive species were confirmed as self-incompatible, some plants within most accessions were able to self-pollinate. There was no significant interaction between accessions and pollination type for most traits, except for seed set which was attributed to interspecific introgression. The self-compatibility of some plants was transmitted to their progeny. No significant correlation between self-pollination and spread distance from the proposed entry point for the exotic species was found. The occurrence of self-compatible plants was demonstrated in both species and this fact could in part explain the high invasive ability of annual *Helianthus* species in Argentina.

Key words: Gene flow, mating system, seed set, self-compatibility, sporophytic SI

RESUMEN

Helianthus petiolaris y *H. annuus* son invasores exóticos que se han extendido en el centro de Argentina en los últimos 70 años. Como otras anuales del mismo género, estas especies son de polinización cruzada y llevan un mecanismo de auto-incompatibilidad esporofítica. Se investigó la capacidad de auto-polinización en plantas de cinco colecciones de cada especie, su influencia sobre algunos aspectos reproductivos y en comparación con el girasol cultivado, en el que el mejoramiento para la auto-compatibilidad ha sido exitoso. Las plantas se auto-polinizaron con los capítulos tapados por bolsas, se auto-polinizaron de manera forzada manualmente o se permitió la polinización cruzada. Aunque ambas especies invasoras fueron confirmadas como auto-incompatibles, algunas plantas dentro de la mayoría de las colecciones fueron capaces de auto-polinizarse. No hubo interacción significativa entre las colecciones y el tipo de polinización para la mayoría de los rasgos, excepto para la producción de semillas que se debió a la introgresión interespecífica. La auto-compatibilidad de algunas plantas se transmitió a su descendencia. No se encontró una correlación significativa entre la auto-polinización y la distancia de propagación desde el punto de entrada propuesto para las especies exóticas. La aparición de las plantas auto-compatibles se demostró en ambas especies y este hecho podría explicar en parte la alta capacidad invasiva de las especies anuales *Helianthus* en Argentina.

Palabras clave: flujo de genes, sistema de apareamiento, producción de semilla, auto-compatibilidad, auto-incompatibilidad esporofítica

Fecha de recepción: 22/05/2014
Fecha de aceptación de versión final: 20/08/2014

INTRODUCTION

Sunflower, *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) is a self-incompatible species by nature and annual *Helianthus* spp. are mostly obligate allogamous (Heiser *et al.*, 1969). Plant cross-pollination depends on insects, mainly bees. As in other members of the family, the self-incompatible mechanism is sporophytic, where the pollen grain phenotype is determined by the diploid genotype of the anther where they originate (Hiscock and McInnis, 2003). Self-incompatibility is based in protein interactions produced by a unique S-locus that comprises two genes, one expressed in the pistil (female determinant) and another in the anther or pollen grains (male determinant). These genes are closely linked and are considered as a single gene. Proteins produced by female and male determinants interact at the time of pollen grain germination on the stigmata and lead to the arrest of pollen tube growth. Fernandez Martinez and Knowles (1978) proposed a gene control based in a single locus with multiple alleles, with dominant expression in pollen and other mechanisms in style. Gandhi *et al.* (2005) confirmed a self-incompatible S-locus with multiple alleles in linkage group 17. S-alleles causing self-compatibility would originate a loss of function mutations (Hiscock and McInnis, 2003) where self-incompatibility is controlled by a dominant or semi-dominant allele and self-pollination is attributable to the recessive condition, ss.

In sunflower if there is no cross pollination, the hermaphrodite flower design allows self-pollination, although this mechanism is not efficient (Charlet *et al.*, 1997). Values of up to 80-100% self-fertility have been achieved by breeding for self-compatibility. Self-compatible genotypes have higher yields than self-incompatible ones when bees are not abundant and the trait is transmitted from elite lines to hybrids. Self-incompatibility and self-fertility degrees depend on three conditions: gene control, environment, and floral structures (Miller and Fick, 1997).

Natural selection during the invasion process of a species could originate self-compatible populations which derive from self-incompatible populations as ancestors. Therefore, invasive species with individuals which vary in their compatibility degree could originate self-compatible populations through mate system selection

(Petanidou *et al.*, 2012). A quantitative trait observed in self-incompatible mechanisms is pseudo-self-compatibility (PSC) in which different factors cause variation in the strength of the self-incompatible system, leading to some levels of self-fertilization; yet, seed set is typically lower than in completely compatible cross-pollinations. There are three types of PSC (Hiscock, 2000): a) environmental, induced by temperature and day length. In this regard, Stephens (2008) found that high temperatures induced PSC; b) artificial, generated by mechanical or chemical treatments; and c) genetic, caused by the modifying action of an independent locus different from the S-locus.

In absence of cross-pollination a PSC mechanism could operate, allowing a late acceptance of self-pollen under the control of a second G-modifier locus present in Asteraceae and Brassicaceae. This mechanism could have favored *Senecio squalidus* following its introduction and rapid spread in the UK (Brennan *et al.*, 2011).

Gene flow from crops to wild and feral populations has been involved in the evolution of a number of weeds, including novel invasive species (Ellstrand, 2003). *Helianthus petiolaris* and *H. annuus* ssp. *annuus* were introduced in Argentina between 1940 and 1950 and, since then, both species quickly spread becoming invasive biotypes. Only one entry point for each species has been registered (Cantamutto *et al.*, 2010). These species have long life cycles and produce many small heads, while domesticated sunflower has a shorter cycle and produce only one big head. Gene flow among both species and sunflower crop has been confirmed (Ureta *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2010). The breakdown of self-incompatibility was studied in these species in their center of origin: heterospecific pollen can induce self-pollination in both species, *i.e.* *H. petiolaris* pollen on *H. annuus* stigmata and vice-versa, an event known as mentor effect (Desrochers and Rieseberg, 1998).

Our observations during collection trips and in the experimental field indicate that some *Helianthus* plants from natural populations are likely able to self-pollinate, and that would explain in part their invasive ability. The aim of this work was to verify self-compatibility in different naturalized populations of these two annual *Helianthus* spp. and to relate this trait to the invasive process.

MATERIALS AND METHODS

In 2012, plants of five accessions of *H. annuus* ssp. *annuus* and five accessions of *H. petiolaris* representative of natural populations from different geographic locations of Argentina were established in the experimental field (Table 1). The populations differed in distance from the proposed entry point for each species (Cantamutto *et al.*, 2010). A plot of commercial hybrid sunflower was sown at the same time. Previously, wild seeds were maintained at 4° C during one week to break dormancy. Seeds were sown in multicell plastic trays in the greenhouse and allowed to grow with proper watering until the seedlings had 4-6 leaves, stage at which they were transplanted to the experimental field belonging to Department of Agronomy, Universidad Nacional del Sur (S 38°41'38", W 62°14'53").

Plots were established with 10 plants, each divided into rows 0.70 m apart with a distance of 0.20 m between plants. A drip irrigation system was used and weed control

was manual. Five plants within each invasive population accession and 10 sunflower plants (cv. Nidera P104CL) were randomly sampled. At emergence of the ray flowers or in the previous reproductive stage R3, according to the scale by Schneiter and Miller (1981), three heads per plant of invasive *Helianthus* accessions were bagged to prevent the access of foreign pollen. Two of the three covered heads were manually selfed 2-3 times from the beginning to the end of the flowering period, with pollen from another flower of the same plant. To force self-fertilization two heads were rubbed together, or pollen was transferred with cotton brushes. The third head of each plant was kept bagged. Five sunflower heads were allowed to self-pollinate under bags placed at R4 crop stage. A fourth head of each *Helianthus* sp. plant and five crop sunflower heads, selected at the same stage and grown without cover, were used to assess open pollination.

Table 1. Origin of wild accessions used in the study. Localities span over 988 km from East to West and 1000 km from North to South in Argentina

Locality (CODE)	Department	Province	Distance from entry point (km) ¹
<i>Helianthus petiolaris</i>			
Catriló (CAT)	Catriló	La Pampa	0
Colonia Barón (BAR)	Quemú Quemú	La Pampa	112
Ataliva Roca (ROC)	Toay	La Pampa	160
Padre Buodo (BUO)	Utracán	La Pampa	237
Alpachiri (ALP)	Guatraché	La Pampa	324
<i>Helianthus annuus</i> ssp. <i>annuus</i>			
Rancul (RAN)	Rancul	La Pampa	540
Colonia Barón (BAR)	Quemú Quemú	La Pampa	707
Diamante (DIA)	Diamante	Entre Ríos	826
Media Agua (MAG)	Sarmiento	San Juan	991
Las Malvinas (LMA)	San Rafael	Mendoza	1080

¹ Entry point was Catriló (La Pampa) for *H. petiolaris* and Río Cuarto (Córdoba) for *H. annuus annuus*

Seed loss by shattering was prevented by bagging open pollination heads at R6 stage. The following data were collected: disc diameter, number of filled seeds (grains) per head, number of empty seeds per head, weight of filled grains. Based on these data, other parameters were calculated as follows: seed set, as the number of filled seeds / (filled seeds + empty seeds); grain biomass, as the weight of filled grains/grain number. Data were taken as proportions and the logit transformation, $\log(p/(100-p))$, was applied to satisfy the normality assumption of ANOVA. Mean comparisons were made by the LSD Fisher test. Data were analyzed using the statistical package INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Self-Compatibility Index (SCI, Lloyd and Schoen, 1992) was used to classify plants as self-compatible or self-incompatible. We calculated SCI as seed set after manual pollination/seed set after open pollination. SCI varies from 0 to ≥ 1 , where 1 represents complete self-compatibility. A plant was considered self-compatible if $SCI > 0.75$. This index is useful to compare populations from different environments.

The progeny ($N \leq 12$) of plants showing self-compatibility ($SCI > 0.75$) was tested the following season under the same experimental conditions. Seed production in the progeny by self-pollination (bagged and forced) and cross-pollination (open pollination) was measured. The SCI index was used to classify self-compatible or self-incompatible off-spring.

RESULTS

Comparisons were made between accessions of each wild species and for selfed and open-pollinated heads for six traits. No significant differences were found between accessions for most traits within both invasive species, but pollination type did show highly significant differences (Table 2). In *H. petiolaris* significant differences among accessions were found in filled seed, whereas in *H. annuus* highly significant differences were found in disc diameter and number of empty seed, and significant differences in seed set.

No significant differences for the interaction between accession and pollination type were found, except for number of empty seed and seed set in *H. annuus*.

As there was no accession x pollination type interaction, we performed a Kruskal-Wallis analysis to evaluate the

effect of pollination type on six traits considering the accessions as replicates. No transformation of data was applied for this analysis, so means were readily compared (Table 3).

Most studied traits were influenced by the pollination type. Disc diameter was larger with open pollination (OP) in invasive biotypes, whereas it was not affected in cultivated sunflower. Open-pollination favoured seed production per head, seed set, and seed yield (in weight) in all accessions, but grain biomass was not affected by pollination type. The number of empty seed showed no differences between bagged and forced selfing in *Helianthus* spp., but highly significant differences were found between selfing and open pollination in the three biotypes. Grain yield was higher with forced selfing compared to natural selfing, and it was highest for open pollination in both wild species. Same values in seed set under open pollination were observed in the three biotypes.

SCI index showed that seed production within each accession was variable (Figure 1). Among *Helianthus petiolaris* accessions CAT, BAR, ROC and BUO, there were plants showing a certain degree of self-pollination. Some were considered to be self-compatible ($SCI > 0.75$), and others were only partially compatible ($SCI 0.25-0.75$). ALP was the only accession in which plants produced very scarce seed by selfing. ROC accession also showed high percentages of self-incompatible plants ($SCI 0-0.25$).

Within *H. annuus* accessions, only three plants showed high seed production and could be considered self-compatible ($SCI > 0.75$), whereas most plants were self-incompatible ($SCI 0-0.25$), being the incompatibility 100% for BAR accession. The cultivated sunflower crop had the highest percentage of self-compatible plants.

Analyzed plants were plotted on a graph relating seed produced by natural selfing and by forced selfing (Figure 2). Most plants of both *Helianthus* species were self-incompatible and located in the low left corner of the graph. These plants produced very small amount of seed, if any. Among 50 analyzed wild plants, 10 had varying degrees of self-compatibility; of these, two individuals of *H. petiolaris* (BAR accession) and *H. annuus* (LMA accession) showed high self-compatibility.

In general, self-compatibility of the progeny of plants subject to self-pollination was higher than in their parents (Figure 3). Some progenies of self-compatible plants of both species produced seeds and segregated for SCI index. In *H. petiolaris*, offspring of three out of nine analyzed

mother plants segregated for SCI index, whereas in *H. annuus*, offspring of nine out of 15 mother plants also showed segregation.

Regarding the entry point in both species, correlation between population distance and proportion of self-pollinating plants in the first generation was not significant: $R^2=0.31$, $p=0.32$ for *H. petiolaris* and $R^2=0.02$, $p=0.82$ for *H. annuus annuus*.

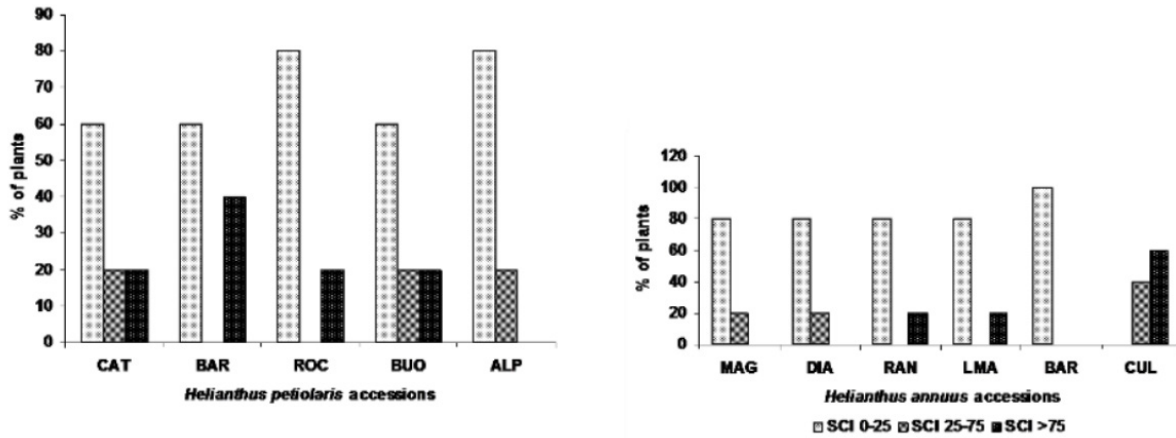


Figure 1. Variation in the mating system according to SCI index among plants in accessions of *Helianthus petiolaris* and *H. annuus*. SCI varies from 0 to ≥ 1 . SCI > 0.75 considered self-compatible. Code accessions in Table 1. CUL: cultivated sunflower.

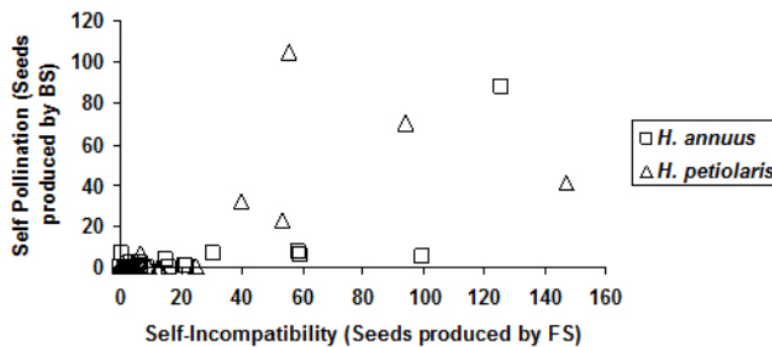


Figure 2. Seed production per plant with bagged selfing (BS) and forced selfing (FS) in invasive *Helianthus* accessions.

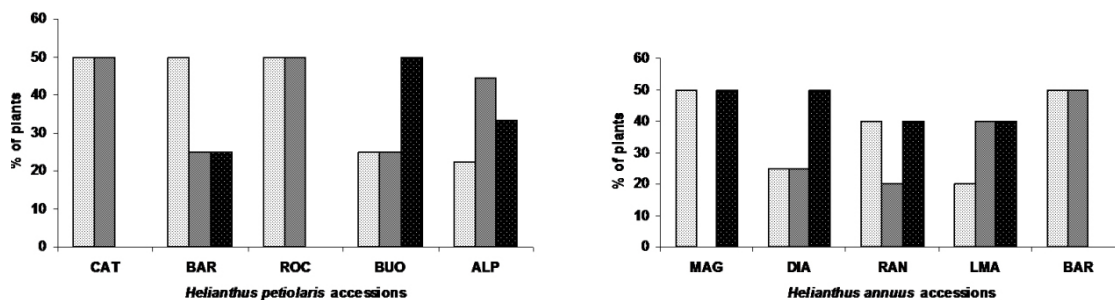


Figure 3. SCI index among progenies of self-fertilized plants of *Helianthus petiolaris* and *H. annuus* ssp. *annuus*. SCI varies from 0 to ≥ 1 . SCI > 0.75 considered self-compatible. Code accessions in Table 1.

Table 2. ANOVA of reproductive traits of *H. petiolaris* and *H. annuus* accessions with two pollination types (selfing and open-pollination); ns not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01

Trait	Factor	F	p-value	Significance
<i>Helianthus petiolaris</i>				
	Accession	1.45	0.228	ns
Disc diameter	Pollination type	7.15	0.002	**
	Interaction AxPt	0.24	0.981	ns
	Accession	2.74	0.037	*
Filled seed	Pollination type	70.11	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.82	0.090	ns
	Accession	2.12	0.089	ns
Empty seed	Pollination type	104.62	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.56	0.156	ns
	Accession	1.27	0.290	ns
Seed set	Pollination type	129.23	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.26	0.283	ns
	Accession	1.38	0.253	ns
Grain weight	Pollination type	3.63	0.032	*
	Interaction AxPt	1.33	0.245	ns
	Accession	0.79	0.539	ns
Grain biomass	Pollination type	0.56	0.574	ns
	Interaction AxPt	1.29	0.268	ns

Trait	Factor	F	p-value	Significance
<i>Helianthus annuus ssp annuus</i>				
Disc diameter	Accession	4.82	0.002	**
	Pollination type	12.80	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.04	0.415	ns
Filled seed	Accession	1.47	0.221	ns
	Pollination type	75.02	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.45	0.193	ns
Empty seed	Accession	9.59	<0.0001	**
	Pollination type	183.13	<0.0001	**
	Interaction AxPt	2.94	0.008	**
Seed set	Accession	3.90	0.029	*
	Pollination type	236.87	<0.0001	**
	Interaction AxPt	2.18	0.041	*
Grain weight	Accession	2.29	0.070	ns
	Pollination type	48.53	<0.0001	**
	Interaction AxPt	1.87	0.080	ns
Grain biomass	Accession	0.59	0.735	ns
	Pollination type	2.95	0.060	ns
	Interaction AxPt	1.09	0.381	ns

Table 3. Effect of pollination type on reproductive traits in *Helianthus* species. Different letters indicate significant differences in the Kruskal-Wallis test. BS: Bagged selfing, FS: forced selfing, OP: open pollination

Pollination type	Disc diameter (cm)	Filled seed (n/head)	Empty seed (n/head)	Seed set (filled/total)	Seed yield (g/head)	Seed biomass (mg)
<i>Helianthus petiolaris</i>						
BS	1.98 a	11.56 a	189.52 b	0.057 a	0.13 a	7 a
FS	2.05 a	20.14 b	183.66 b	0.098 a	0.26 b	17 a
OP	2.33 b	115.20 c	33.48 a	0.774 b	0.52 c	11 a
<i>Helianthus annuus ssp annuus</i>						
BS	3.26 a	5.60 a	368.80 b	0.015 a	0.20 a	36 a
FS	3.52 a	21.13 b	336.53 b	0.059 b	0.44 b	22 a
OP	4.27 b	230.36 c	60.00 a	0.793 c	3.24 c	14 a
<i>Helianthus annuus var. macrocarpus (crop)</i>						
BS	11.50 a	911.40 a	503.40 b	0.644 a	38.56 a	41 a
OP	12.30 a	1158.2 b	305.80 a	0.791 b	49.30 b	42 a

DISCUSSION

Seeds of invasive biotypes were collected at different localities to compare accessions in the experimental field. Selfed and open-pollinated plants of both *H. petiolaris* and *H. annuus annuus* showed similar values among accessions. We discarded mentor effect (Desrochers and Rieseberg, 1998) because selfed heads were bagged during all the experiment. The low number of filled seeds in *H. petiolaris* accessions CAT and BAR and the low total grain weight in CAT could be explained because in both places the species grows close to sunflower crop, *H. annuus* var. *macrocarpus*. Crop-wild gene flow has been confirmed (Ureta *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2010) and presumably interspecific hybrids or their progenies could be partially sterile. Advanced generation hybrids or backcrosses to *H. petiolaris* are almost indistinguishable from the latter (Gutierrez *et al.*, 2012). Among *H. annuus* accessions, RAN

showed the lowest values for seed and grain parameters which was attributed to inbreeding depression, since it is a small population that has been isolated for more than ten years. BAR had the largest discs probably because of gene flow from sunflower crop, whereas DIA had the smallest ones, since this population is isolated from the crop.

As expected, open pollination favoured all traits in *Helianthus* spp. populations, which are naturally self-incompatible, as well as in the sunflower crop. The latter is self-compatible, but heads were covered and therefore were not accessible to bees for pollination. These species depend on pollinators, mainly bees and this explains the differences in the number of seeds and grain weight between bagged pollinated and manually pollinated heads.

Differences in disc diameter were attributed to the amount of seed set in each case. Higher seed production

contributed to the development of the receptacle (disc) in *Helianthus* species. In *H. annuus annuus* the significant difference in total grain weight was probably due to flowers that were fertilized by crop pollen, since sunflower commercial hybrids were grown at the same time in the experimental field.

Seed set in open-pollinated invasive biotypes was not very high, 79% in *Helianthus annuus* and 77% in *H. petiolaris*, but this is not unusual. In a previous study in the same experimental field, the average seed set of four populations was 60% for *H. annuus* and 72% for *H. petiolaris* (Ureta *et al.*, 2008). Seed set in cultivated sunflower was 79.3%, which was similar to that obtained in this work (80%).

Seed set differences between bagged (NS) and forced selfing (FS) in the wild biotypes were attributed to the effect of pollinators, known as geitonogamy, or pollination between different flowers of the same individual. In a commercial sunflower hybrid, the term applies to pollination among flowers of different plants, since all plants have the same genotype. This explains differences in seed production in the highly self-compatible cultivated biotype, although this varies according to genotypes (Astiz *et al.*, 2011).

The degree of self-compatibility depends on environmental conditions and pollinating vectors visiting the flowers, and can vary between flowers and between plants (Luciano *et al.*, 1965; Astiz *et al.*, 2011). A plant is considered self-compatible if $SCI > 0.75$. This index is used to compare populations of different environments (Petanidou *et al.*, 2012).

SCI index graphs for parental and progeny generations show an increase in plant frequency with higher SCI values in all the accessions; however, there were variations. For example, no $SCI > 0.75$ were observed among progeny of ROC plants and some low SCI plants appeared in ALP. This suggests that the self-compatibility trait is heritable and that there are factors affecting allelic interactions in the self-incompatibility system. Incompletely dominant or weak S alleles in wild *H. annuus* were suspected (Gandhi *et al.*, 2005) but allelic relationships have not been studied in *Helianthus*, even though breeding has succeeded in converting sunflower into a self-compatible species (Luciano *et al.*, 1965; Miller and Fick, 1997). Crosses are needed among different SCI indexed plants in order to unravel the allelic polymorphism in invasive *Helianthus*.

The two annual *Helianthus* species have spread widely with a striking success after their introduction in Argentina. They form extensive populations in the central part of the country and new patches can be found every year (Poverene *et al.*, 2008). Entry occurred *ca.* 70 year ago; the way both species arrived is uncertain and they seem to have spread from a single entry point (Cantamutto *et al.*, 2010). However, we were not able to find a correlation between self-pollination and spread distance from the entry point for both species.

According to Baker's Law, successful colonizing and invasive plants are usually self-compatible (Baker, 1967) but there are exceptions (Petanidou *et al.*, 2012). Hiscock (2000) argued that during population bottlenecks self-incompatible mechanisms may break down, and pseudo-self-compatibility (PSC) facilitates the invasion by an otherwise strong self-incompatible species, as in *Senecio squalidus* (Asteraceae). A modifying G-locus has been proposed in this species as a consequence of disturbances following introduction and rapid spread within a new environment (Brennan *et al.*, 2011). In PSC seed set in self-pollinated plants is lower compared to open-pollinated plants. This was true for most plants producing seeds by self-pollination in *Helianthus annuus* and *H. petiolaris* accessions, though ratios of self-pollination to cross-pollination seeds were very variable. The ratio is environment - or age - dependent and also PSF is characterized by a continuous distribution of self-fertility in the progeny (Levin, 1996). This should be further investigated in *Helianthus* and we plan to make artificial crosses among plants showing different SCI indexes. Abbot *et al.* (2009) stressed the argument that hybridization has preceded invasion in *S. squalidus*, a feature that also holds for wild *Helianthus* species in Argentina. Introgression of crop genes could be the way to acquisition of null S-alleles that allow self-fertilization. Moreover, *H. petiolaris* and *H. annuus* differ in a number of structural chromosome changes, *i.e.* translocations and inversions, both involving linkage group 17 (Burke *et al.*, 2004), where the S-locus is located (Gandhi *et al.*, 2005). Hybridization between these *taxa* could disrupt and in some way alter gene expression in that locus, causing PSF and enhancing invasiveness. Even though the genetic mechanism deserves further research, it is clear that self-pollination occurs, and this trait is inherited by the next generations in both invasive *Helianthus* species.

REFERENCES

- Abbott R.J., Brennan A.C., James J.K., Forbes D.G., Hegarty M.J., Hiscock S.J. (2009) Recent hybrid origin and invasion of the British Isles by a self-incompatible species, Oxford ragwort (*Senecio squalidus* L., Asteraceae). *Biological Invasions* 11:1145–1158.
- Astiz V., Iriarte L.A., Flemmer A., Hernández L.F. (2011) Self-compatibility in modern hybrids of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Fruit set in open and self-pollinated (bag isolated) plants grown in two different locations. *Helia* 54: 129–138.
- Baker H.G. (1967) Support for Baker's Law – as a rule. *Evolution* 21: 853–856.
- Brennan A.C., Tabah D.A., Harris S.A., Hiscock S.J. (2011) Sporophytic self-incompatibility in *Senecio squalidus* (Asteraceae): S allele dominance interactions and modifiers of cross-compatibility and selfing rates. *Heredity* 106: 113–123.
- Burke J.M., Lai Z., Salmaso M., Nakazato T., Tang S., Heesacker A., Knapp S.J., Rieseberg L.H. (2004) Comparative mapping and rapid karyotypic evolution in the genus *Helianthus*. *Genetics* 167: 449–457.
- Charlet L.D., Brewer G., Franzmann B.A. (1997) Sunflower insects. In: Schneiter A.A. (Ed.) *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph 35, ASA-CSSA-SSSA Press, Madison, Wisconsin, USA, pp. 183–261.
- Cantamutto M.A., Torres L.I., Presotto A., Gutierrez A., Ureta S., Poverene M. (2010) Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual *Helianthus* populations in central Argentina. *Biological Invasions* 12: 541–551.
- Desrochers A., Rieseberg L.H. (1998) Mentor effects in wild species of *Helianthus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 85: 770–775.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2013) InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ellstrand N.C. (2003) *Dangerous liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Fernandez Martinez J., Knowles P.F. (1978) Inheritance of self incompatibility in wild sunflower. In: Proc 8th Int Sunflower Conf. Minneapolis, Int. Sunflower Assoc, Paris, pp. 484–489.
- Gandhi S.D., Heesacker A.F., Freeman C.A., Argyris J., Bradford K., Knapp S.J. (2005) The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 111:619–629.
- Gutierrez A., Carrera A., Basualdo J., Rodriguez R., Cantamutto M., Poverene M. (2010) Gene flow between cultivated sunflower and *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Euphytica* 172: 67–76.
- Gutierrez A., Cantamutto M., Poverene M. (2012) Introgression of cultivated sunflower into exotic *Helianthus petiolaris* populations. *Journal of Basic and Applied Genetics* 23: 25–36.
- Heiser C.B., Smith D.M., Clevenger S.B., Martin W.C. (1969) The North American sunflowers (*Helianthus*). *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 22: 1–218.
- Hiscock S.J. (2000) Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Annals of Botany* 85 (Supplement A): 181–190.
- Hiscock S.J., McInnis S.M. (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends in Plant Science* 8: 606–613.

- Levin D.A. (1996) The evolutionary significance of pseudo-self-fertility. *American Naturalist* 148: 321-332.
- Lloyd D.G., Schoen D.J. (1992) Self-fertilization and cross-fertilization in plants. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369.
- Luciano A., Kinman M.L., Smith J.D. (1965) Heritability of self incompatibility in the sunflower (*Helianthus annuus*). *Crop Science* 5: 529-532.
- Miller J.F., Fick G.N. (1997) The Genetics of Sunflower. In: Schneiter A.A. (Ed.) *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph 35, ASA-CSSA-SSSA Press, Madison, Wisconsin, USA, pp. 441-496.
- Petanidou T., Godfreeb R., Songa D., Kantsaa A., Dupontd Y., Wasere N. (2012) Self-compatibility and plant invasiveness: Comparing species in native and invasive ranges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 3-12.
- Poverene M., Cantamutto M., Seiler G.J. (2008) Ecological characterization of wild *Helianthus annuus* and *H. petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization* 7: 42-49.
- Schneiter A.A., Miller J.F. (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21: 901-903.
- Stephens L.C. (2008) Self-incompatibility in *Echinacea purpurea*. *HortScience* 43: 1350-1354.
- Ureta S., Cantamutto M., Carrera A., Delucchi C., Poverene M. (2008) Natural hybrids between cultivated and wild sunflowers in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 1267-1277.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants ANPCYT PICT 2854 and PGI UNS 24A204.

MORPHOLOGICAL PHENOTYPES, POLLEN VIABILITY AND POLLEN-PISTIL RELATIONS IN THREE NATURAL POPULATIONS OF THE WILD POTATO *Solanum chacoense* BITTER

FENOTIPOS MORFOLÓGICOS, VIABILIDAD DEL POLEN Y RELACIONES POLEN-PISTILO EN TRES POBLACIONES NATURALES DE LA PAPA SILVESTRE *Solanum chacoense* BITTER

Poulsen Hornum A.¹, Camadro E.L.^{1,2,3*}

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina.

²Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Balcarce, Bs. As., Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

*Author for correspondence

camadro.elsa@inta.gob.ar

ABSTRACT

Argentina is center of diversity of approximately 35 wild taxonomic potato species that have wide geographical distribution. These species, which form polyploid series with $2n=2x=24$ up to $2n=6x=72$ ($x=12$), can reproduce both sexually and asexually. Most of them are diploid obligate outcrossers because they possess a one-locus gametophytic self-incompatibility system. In nature, wild potatoes can present both external and internal reproductive isolation barriers, within and between populations, which can be incomplete. Most accessions in germplasm banks have been assigned specific categories based on morphological phenotypes (taxonomic species concept), without taking into account the natural reproductive behavior of the sampled populations. One of these species, *Solanum chacoense* Bitter ($2n=2x=24$, 2 EBN¹), spontaneously grows from the NW provinces to SE Buenos Aires province, in very diverse habitats and overlapping with other taxonomic potato species, with which it can spontaneously hybridize. As preliminary activities of an *in situ* study, individual plants from three populations classified as *S. chacoense* (APEC-1, APEC-2 and APEC-3) that spontaneously grow in Balcarce, Buenos Aires province, were characterized for morphological phenotypes of leaves, flowers and fruits, pollen viability and pollen-pistil relations. The percentage of pollen viability (determined by staining) varied from 34.5 to 98.8% (\bar{x} 81.3%) in APEC-1 ($n=23$), 0 to 98.8% (\bar{x} 62.8%) in APEC-2 ($n=26$) and 63.3 to 95.4% (\bar{x} 85%) in APEC-3 ($n=21$). Variability was also observed for pollen size ($<n$, $2n$, $> 2n$ and $4n$, in addition to normal n) and pollen size frequency. Abnormalities were observed at the tetrad stage of meiosis in eight plants of APEC-2 with heterogeneous-size pollen. According to the site of pollen tube arrest, pollen-pistil relationships within APEC-1 and APEC-2 revealed events of cross-incompatibility and/or self-incompatibility, whereas only cross-incompatibility was detected within APEC-3. No relations were found between morphological phenotypes and pollen-pistil reactions, and between corolla shape and pollen viability. The results are indicative of a likely hybrid origin of the studied populations and the need for revising the current taxonomic approaches in wild potatoes.

¹Ebn: Endosperm Balance Number (Johnston *et al.*, 1980)

Key words: pollen viability, pollen-pistil relations, wild potatoes, spontaneous hybrids

RESUMEN

Argentina es centro de diversidad de aproximadamente 35 especies silvestres de papa, que tienen amplia distribución geográfica. Estas especies, que forman series poliploides con $2n=2x=24$ hasta $2n=6x=72$ ($x=12$), pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente. La mayoría de ellas son diploides, y algamas obligadas debido a que poseen un sistema de auto-incompatibilidad gametofítica. En la naturaleza, las papas silvestres presentan barreras de aislamiento reproductivo externas e internas, dentro y entre poblaciones, que pueden ser incompletas. A la mayoría de las colecciones de bancos de germoplasma se les ha asignado categoría específica en base a fenotipos morfológicos (concepto de especie taxonómica), sin considerar el comportamiento reproductivo natural de las poblaciones muestreadas. Una de estas especies, *Solanum chacoense* Bitter ($2n=2x=24$, 2NBE²), crece espontáneamente desde las provincias del noroeste hasta el sudeste de la provincia de Buenos Aires, en hábitats diversos y superponiéndose en su distribución con otras especies taxonómicas de papa con las que puede hibridarse espontáneamente. Como actividades preliminares de un estudio *in situ*, se caracterizaron por fenotipos morfológicos de hojas, flores y frutos, viabilidad de polen y relaciones polen-pistilo, tres poblaciones naturales de Balcarce, provincia de Buenos Aires, clasificadas como *S. chacoense* (APEC-1, APEC-2 y APEC-3). El porcentaje de viabilidad del polen (determinado por tinción) varió de 34,5 a 98,8% ($\bar{x}81.3\%$) en APEC-1 ($n=23$), 0 a 98,8% ($\bar{x}62.8\%$) en APEC-2 ($n=26$) y 63,3 a 95,4% ($\bar{x}85\%$) en APEC-3 ($n=21$). Además, se observó variabilidad para tamaño de polen ($<n$, $2n$, $>2n$ y $4n$, en adición al polen n normal) y para frecuencia según tamaño. Se observaron anomalías en el estadio de tetrada en ocho plantas de APEC-2 con polen de tamaño heterogéneo. De acuerdo al sitio de detención del tubo polínico, las relaciones polen-pistilo dentro de APEC-1 y APEC-2 revelaron eventos de incompatibilidad cruzada y/o autoincompatibilidad mientras que en APEC-3 sólo se detectó incompatibilidad cruzada. No se encontraron relaciones entre fenotipos morfológicos y reacciones polen-pistilo, ni entre forma de corola y viabilidad de polen. Los resultados obtenidos son indicativos de un posible origen híbrido de las poblaciones estudiadas y de la necesidad de revisar el enfoque taxonómico en las papas silvestres.

² NBE: Número de Balance del Endosperma (Johnston *et al.*, 1980)

Palabras clave: híbridos espontáneos, papas silvestres, relaciones polen-pistilo, viabilidad de polen

Fecha de recepción: 01/03/2014
Fecha de aceptación de versión final: 25/07/2014

INTRODUCTION

Wild potatoes (*Solanum* L. sp.) are native to the Americas, where they present a wide geographical distribution. In fact, wild potato populations spontaneously grow in very diverse –and sometimes contrasting– habitats from southwestern USA, through Mexico and Central America, to southern Chile and Argentina, and extending to the east into Brazil, Uruguay and Paraguay (Hawkes and Hjerting, 1969). They form polyploid series with $2n=2x=24$ up to $2n=6x=72$ ($x=12$), being diploid the most frequent ploidy level. The number of taxonomic wild potato species varies according to various taxonomic treatments. In this paper, we follow Hawkes and Hjerting's (1969) treatment because it more adequately accommodates genetic results than more recent treatments.

The successful colonization of diverse environments by wild potatoes is reflected in the variety of morphological phenotypes that they exhibit, from those that are very similar to the common (cultivated) potato, *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*, to others that are quite different. They may have either simple or, more often, compound leaves, with leaflets varying in shape from lanceolate to ovate and elliptic, with or without interjected leaflets. Flowers can be present either arranged in inflorescences or solitary. Corollas can have various shapes, from very stellate to stellate, semi-rotated and rotated, among others, with colors varying from white to cream, blue, and purple (Hawkes and Hjerting, 1969). The current taxonomy in the group makes use of the Taxonomic Species Concept, according to which specific status is assigned to a plant or sample of plants on the basis of morphological phenotypes in comparison with holotypes, which are herbarium specimens –or drawings or pictures of the specimens– that were used for the formal description of a species or lower-rank taxon (Camadro *et al.*, 2012).

Breeding system

Wild potatoes have two alternative modes of reproduction available to them: sexual (by seeds) and asexual (by stolons and tubers), which confer particular advantages to spontaneous populations in terms of genetic flexibility under varying conditions and fitness under stable ones (Camadro *et al.*, 2012). Both, wild and cultivated potatoes possess a gametophytic self-incompatibility system controlled by the multiallelic S-locus, which prevents self-fertilization (and also crossing between closely related

individuals) as a result of identity of S-alleles in pollen and style. Such self-incompatibility system, very strict in diploids and one of the most studied intraspecific barriers in higher plants (Takayama and Isogai, 2005), ensures the maintenance of high levels of heterozygosity in the population.

Cytogenetics

Normal meiosis in potatoes consists of a first meiotic division followed (without previous cytokinesis) by a second meiotic division in which the Anaphase II spindles are oriented at about 60° angles, the formation of two simultaneous cleavage furrows, and the final tetrahedron disposition of the four microspores (Mok and Peloquin, 1975). Abnormalities in spindle orientation in Anaphase II (“parallel spindles”, “fused spindles” or “tripolar spindles”) are rather frequent in potatoes and can lead to the formation of $2n$ pollen (den Nijs and Peloquin, 1977; Camadro and Peloquin, 1980; Veilleux *et al.*, 1982; Watanabe and Peloquin, 1991; Carputo *et al.*, 2003). In “parallel” and “fused” spindles, the second meiotic division spindles are, respectively, parallel or parallel and fused, and a single cleavage furrows produces a dyad of two $2n$ microspores. In the tripolar configuration, spindles are fused at one end and cleavage furrow formation results in a triad of one $2n$ and two n microspores. The $2n$ microspores are genetically equivalent to those formed by restitution of the first meiotic division (Peloquin *et al.*, 1999). The formation of $4n$ microspores is a consequence of the absence of the normal simultaneous cytokinesis after the second meiotic division (Larrosa *et al.*, 2012).

Reproductive barriers

Higher plants, in general, are isolated by external and internal hybridization barriers. The external barriers can be spatial (physical separation), ecological (*e.g.* adaptation to different habitats or ecological niches in the same geographical area) and seasonal (*e.g.* differences in flowering period in the same geographical area) (Hadley and Openshaw, 1988), whereas the internal barriers, which reside in the plant tissues themselves, can be either pre- or post-zygotic. In wild potatoes, pre-zygotic barriers act at the pollen-pistil level, either preventing pollen germination on the stigma or interfering with normal pollen tube growth along the style and/or in the ovary (Camadro *et al.*, 2004). Post-zygotic barriers act after fertilization and can result in the

formation of inviable or weak F_1 hybrids, sterile F_1 and/or F_2 hybrids, and weak and/or sterile advanced segregating generations. F_1 inviable hybrid formation may be due to disharmony between the genomes of the parental species in the embryo, abnormal development of the endosperm (or collapse of this tissue that lead to embryo abortion) (Hadley and Openshaw, 1988) or overgrowth of maternal tissue in the ovule (Masuelli and Camadro, 1997; Geerts *et al.*, 2002; among others). But even if F_1 hybrids are formed, they can be highly sterile (most frequently, male sterile) or, if they are vigorous and fertile, they can produce weak or sterile F_2 plants or more advanced segregation progenies (Hadley and Openshaw, 1988).

In the literature, wild potato hybrids have been reported as spontaneously growing in diverse –and often contrasting– natural habitats (Correll, 1962; Hawkes, 1963; Ugent, 1966; Okada and Clausen, 1982; among others). In general, however, researchers have been reluctant to recognize the importance of homoploid hybridization in the evolution of the tuber-bearing *Solanum* (see Masuelli *et al.*, 2009). Specific categories are usually assigned to individual plants or population samples on the basis of morphological phenotypes, not taking into account the reproductive behavior and genetic structure of the sampled populations (Masuelli *et al.*, 2009; Camadro *et al.*, 2012; Larrosa *et al.*, 2012). However, classification of wild germplasm is of great importance for *in situ* and *ex situ* conservation of genetic resources, including the application and/or development of methodologies and strategies for proper sampling of the natural genetic variability and its efficient conservation and use.

Solanum chacoense Bitter

One of the wild taxonomic species with the widest geographical distribution is *S. chacoense* Bitter ($2n=2x=24$, 2NBE), which spontaneously grow in Brazil, Paraguay, Bolivia, and Argentina, both in the wild and as a weed in cultivated potato fields. In Argentina, its distribution encompasses over 1,500 km in a North-South transect, occupying very diverse habitats, such as forests, open ranges, dry hillsides and river banks and, in modify habitats,

ditches, roadsides, railway embankments and stone fences among others, both in the shade and in full sun, in damp humiferous soils as well as in soils with high content of clay, sand or stones, at sea level and up to 3,000 masl. In its distribution, *S. chacoense* populations overlap with populations of various other wild taxonomic species, and spontaneous hybrids have been described by Correll (1962) and Hawkes and Hjerting (1969). The species is considered of great value for genetic improvement of the cultivated potato, as a source of heritable resistance/tolerance to adverse biotic and abiotic stresses, and of traits of industrial interest (Ross, 1986; Love *et al.*, 1998; Jansky *et al.*, 2013).

In southern Buenos Aires province, spontaneous wild potato populations grow in disturbed habitats and as weeds in commercial fields of cultivated potatoes and other summer crops. According to plant morphology and geographic distribution, these populations have been classified as *S. chacoense*. The objective of this work was to characterize three of these populations which spontaneously grow in the experimental fields of *Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA*, according to morphological phenotypes of leaves, flowers and fruits, pollen viability and pollen-pistil relations. This preliminary study on the phenotypic variability and reproductive behaviour of *S. chacoense* populations is the first carried out *in situ* –regarding the previously mentioned characteristics– in wild potatoes.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Three spontaneous wild potato populations classified as *S. chacoense* according to morphological phenotypes of leaves, flowers and fruits as described by Hawkes and Hjerting (1969), were sampled in the experimental grounds of *Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA*, in southeastern Buenos Aires province, and assigned the code APEC. Twenty-six randomly sampled plants (genotypes) of APEC-1, 23 of APEC-2 and 29 of APEC-3 were analyzed (Table 1).

Table 1. Provenance of three spontaneous populations, tentatively classified as *S. chacoense* Bitter, from southeastern Buenos Aires province and number of sampled plants.

Population	N° of sampled plants	Localities	Geographic Coordinates	Altitude (m)
APEC-1	26	Balcarce	37°45'32'' S, 58°17'45'' W	141
APEC-2	23	Balcarce	37°45'37'' S, 58°18'09'' W	128
APEC-3	29	Balcarce	37°43'30'' S, 58°17'56'' W	134

Morphological characterization

Individual plants of the three populations were morphologically described according to characteristics of leaves (presence/absence of marginal teeth, pubescence of terminal and lateral leaflets, and presence/absence of intercalary leaflets), flowers (corolla shape, colour, and morphology) and fruits (shape and colour), based on the descriptions of Hawkes and Hjerting (1969). Morphological phenotypes were recorded by digital photography. Within each population, variability for one or more morphological traits was visually observed (*e.g.* corolla shape and/or fruit color); plants were then grouped according to the differential trait(s) for the crossing work.

Pollen viability

At bloom, two flowers were removed from each plant. In a few plants, only flower buds could be sampled. Pollen samples were stained with acetocarmine solution (0.2 g carmine, 45 ml 45% glacial acetic acid and 55 ml distilled water) in the laboratory, for observation under an optical microscope. Approximately 150 grains were recorded in at least four randomly taken visual fields. Pollen grains that were fully stained, plump and with well-defined contours were considered as viable, whereas those that were poorly (or not) stained, and/or irregularly shaped were considered as inviable. Pollen viability was then considered in relation to corolla shape of open flowers.

Pollen size

In samples with heterogeneous size pollen, approximately 150 grains were measured in four to six random microscopic fields. Following Larrosa *et al.* (2012) and based on the volume of a sphere, pollen grains with diameters 1.26 times larger than the average pollen diameter of each sample

were considered to be 2n, those with diameters 1.59 times larger were considered to be 4n, and those with diameters smaller than the average were considered to be <n. Then, the frequency of pollen grains in the five size categories (<n, n, 2n, >2n, 4n) was calculated for each population, as an average of the percentages obtained for the same category using individual plant values. Microphotographs were obtained with an Olympus Q-Color 3 digital camera (Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA).

Sporad analysis

Sporad analysis was performed in eight plants of population APEC-2 from which only flower buds could be sampled and in which unexpected pollen characteristics had been observed, such as heterogeneity in size (<n, 2n, >2n) and/or low viability. Following the standard technique, flower buds were fixed in 3:1 (v/v, absolute alcohol: glacial acetic acid) for 24 h and then transferred to 70% ethanol until use. For microscopic observations, anthers were removed from each bud and gently squashed in a drop of acetocarmine (0.2 g carmine, 45 ml of glacial acetic acid and 55 ml of distilled water) in a slide to release the sporads; after placing coverslips, slides were observed under a light microscope. Microphotographs were obtained with an Olympus Q-Color 3 (Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA) digital camera.

Pollen-pistil relations

Controlled pollinations using individual plants (genotypes) were performed following an incomplete diallel mating design- within and between morphological groups in each population, and according to the availability of flower buds. Flower buds were emasculated one or two days before anthesis and a minimum of two flowers were

pollinated for each combination of genotypes. Forty-eight hours after pollination (HAP), and following Martín's (1958) technique, pollinated pistils were fixed in FAA (1:8:1, v/v/v, acetic acid, 80 ethanol, 40% formaldehyde) for at least one day. For pollen-pistil compatibility studies, fixed styles were stained with aniline blue and observed under a fluorescent microscope. Reactions were classified as (1) compatible (pollen tubes reached the ovules) or (2) incompatible at: (a) stigma (pollen grains did not germinate or, if they did, pollen tube growth was shortly arrested) and (b) style (pollen tube growth was arrested in either the first, second or last third). Pollen-pistil reactions were then considered in relation to morphological phenotypes.

RESULTS

Morphological characterization

In the three populations, variability for morphological phenotypes was observed (Figure 1), although all of them

fell into the formal description of Hawkes and Hjerting (1969). All plants presented compound leaves, varying in shape from lanceolate to ovate and elliptic in APEC-1, and from lanceolate to elliptic in APEC-2 and APEC-3. In APEC-1 and APEC-2, interjected leaflets were either present or absent, whereas in APEC-3, they were always present. In the three populations, white flowers with five petals were arranged in inflorescences. Variability for corolla shape of open flowers (according to Hawkes and Hjerting, 1969) was observed in APEC-1, from very stellate to stellate and semi-rotated, and in APEC-2, from very stellate to stellate; the latter population also presented some flowers with complex morphologies, e.g. corollas were either partly stellate and partly semi-rotated or very stellate and stellate. In APEC-3, flowers were very stellate to stellate and, less frequently, actinomorphic instead of zygomorphic. In the three populations, fruits were ovate and green with rough white spots, but in APEC-2, smooth green fruits were also observed.



Figure 1. Morphological phenotypes in three spontaneous *S. chacoense* populations from southeastern Buenos Aires province. APEC-1 population (A-C), APEC-2 population (D-F), APEC-3 population (G-I). Examples of : leaf (1) compound without interjected leaflet , (2) compound with interjected leaflet; corolla shape (3) stellate, (4) semi-rotated, (5) very stellate, (7) partly stellate and partly semi- rotated, (8) partly stellate and partly very stellate; fruit color (6) green with rough white spots, (9) green.

Pollen viability

The percentage of viable pollen, indirectly estimated by staining in 78 individual plants (using open flowers and fixed buds), varied between and within populations: from 0 in seven plants of APEC-2 to 98.8% in one plant of APEC-1 and in another of APEC-2 (Figure 2). APEC-2 had the lowest average percentage of pollen viability (62.8%; range= 0%-98.8%) in comparison to APEC-1 (81.3%; range= 34.5%-98.8%) and APEC-3 (85%; range= 63.3% -95.4%).

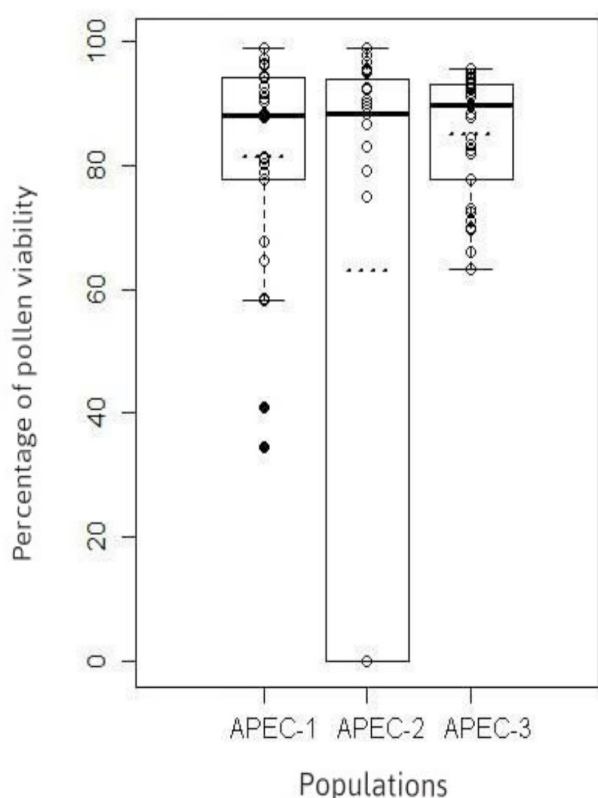


Figure 2. Percentage of pollen viability in three spontaneous *S. chacoense* populations (APEC-1, APEC-2 and APEC-3) from southeastern Buenos Aires province. Boxes: 50% of the central data; highlighted line: median; dotted line: mean; filled circles: outliers.

Pollen Size

Variability for pollen size and frequency of <n, 2n,>2n and 4n pollen grains, in addition to the expected n, was detected in the three populations (Table 2, Figure 3). Individual values for each category varied widely within each population. In relation to the average values, APEC-1

had the lowest percentage of <n pollen grains (0.04% vs. 0.46% in APEC-2 and 0.60% in APEC-3). APEC-1 also had the lowest percentage of >2n pollen grains (0.06% vs. 0.20% in APEC-2 and 0.23% in APEC-3). In turn, APEC-1 was the only population in which 4n pollen grains (0.03%) were detected. APEC-3 also presented the highest percentage of 2n pollen grains (0.67% vs. 0.22% in APEC-1 and 0.30% in APEC-2). The highest average percentage of pollen according to size corresponded to the expected n (99.7%), and was observed in APEC-1. No relation was found between pollen viability and corolla shape of open flowers in any of the populations (Table 3).

Sporad analysis

In the eight plants of APEC-2 that exhibited unexpected pollen characteristics, such as heterogeneity in size (<n, 2n,>2n, in addition to normal n) and low fertility, various abnormalities were observed at the tetrad stage (Table 4, Figure 4).

From 72 to 240 sporads were analyzed. The percentage of tetrads varied from 76% in plant 1 to 100% in plant 16, being the number of abnormal vs. normal tetrads approximately three times higher in the former and 70 times higher in the latter. The percentage of triads ranged from 0.9% in plant 2 to 6.9% in plant 9. Plant 1 also produced 3% dyads, one order of magnitude higher than the observed in plant 4 (0.4%). Monads were observed only in plant 1 (1%) and plant 2 (0.9%). The percentage of pentads varied from 0.8% in plant 9 and plant 4 to 15% in plant 1. Only plant 1 exhibited hexads (4%) and only plant 5 produced heptads (0.7%). Relations between sporad abnormalities and corolla shape could not be explored in the eight plants, because fully opened flowers were not available at the time of bud sampling and later on in the season.

Pollen-pistil relations

Twenty-six crosses (combinations of genotypes) were performed in APEC-1 (Table 5). The reactions observed were: 1) compatible, 30.8%, 2) incompatible, 69.2%, with inhibition of pollen tube growth in: a) stigma (26.9%), b) first third of style (19.2%), c) second third of style (3.9%), d) last third of style (11.5%), and e) stigma + first third of style (7.7%).

In APEC-2, 24 crosses were performed (Table 6). The reactions observed were: 1) compatible, 54.2%, 2)

incompatible, 45.8% with inhibition of pollen tube growth in: a) stigma (12.5%), b) first third of style (4.2%), c) last third of style (8.3%), d) stigma + first third of style (4.2%) e) stigma + last third of style (12.5%) and f) first third of style + second third of style (4.1%).

In APEC-3, 12 crosses were performed (Table 7). The

reactions observed were all incompatible, with inhibition of pollen tube growth in: a) stigma (91.7%) and b) last third of style (8.3%).

No relation was found between morphological within-group phenotypic variation and pollen-pistil reactions (data not shown).

Table 2. Percentage (with minimum and maximum range) of pollen grains classified according to size as <n, n, 2n, >2n y 4n (viable and non-viable) in three spontaneous *S. chacoense* populations from southeastern Buenos Aires province.

Pollen grain size	Population		
	APEC-1 (n=23)	APEC-2 (n=28)	APEC-3 (n=29)
<n	0.04* (0-26)	0.5 (0-16)	0.8 (0-40)
n	99.7 (96.4-100)	99.0 (96.5-100)	98.5 (94.4-100)
2n	0.2 (0-4)	0.3 (0-2)	0.7 (0-4)
>2n	0.1 (0-0.5)	0.2 (0-1.7)	0.2 (0-1.4)
4n	0.03 (0-0.5)	0.0	0.0

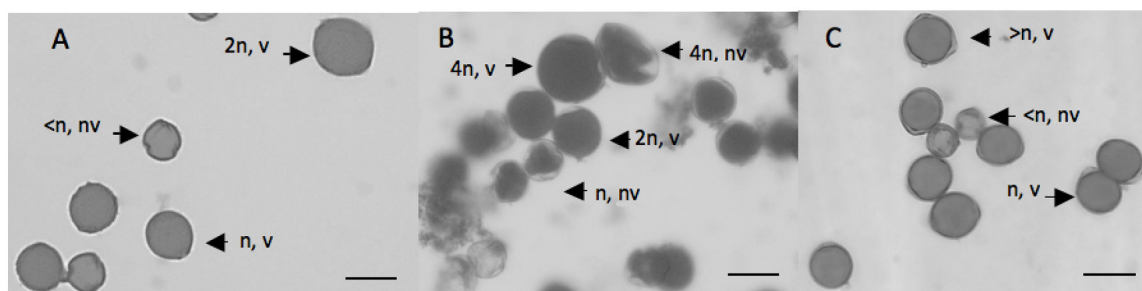


Figure 3. Variability in pollen size and viability in three spontaneous *S. chacoense* populations (A: APEC-1, B: APEC-2 and C: APEC-3) from southeastern Buenos Aires province. v: pollen grains viable, nv: pollen grains non-viable, n: pollen grains with normal size, expected for a gametophytic chromosome number $n = x = 12$. Bars=10 μ m.

Table 3. Corolla shape and percentage of pollen viability in three spontaneous *S. chacoense* populations (APEC-1, APEC-2 and APEC-3) from southeastern Buenos Aires province.

Population	# plants	Corolla shape	% Pollen viability \bar{x} (rank)
APEC-1	3	semi-rotated	71.0 (58.3-90.2)
	9	stellate	90.6 (78.9-97.2)
	13	very stellate	75.9 (41.0-96.4)
APEC-2	1	partly semi-rotated y partly stellate	98.8
	5	semi-rotated	93.9 (86.5-98.8)
	2	stellate	87.6 (83.0-92.1)
	8	partly semi-rotated y partly stellate	92.6 (88.3-96.5)
	1	partly semi-rotated y partly very stellate	97.8
APEC-3	1	partly stellate y partly very stellate	92.1
	1	very stellate	95.3
	8	stellate	81.4 (63.3-93.2)
	18	very stellate	80.2 (66.0-95.4)
	2	partly semi-rotated y partly stellate	76.5 (71.0-81.9)
	2	partly stellate y partly very stellate	93.4 (92.5-94.2)

Table 4. Meiotic abnormalities at the tetrad stage in *S. chacoense* population APEC-2.

Plant	N° meicytes analyzed	% of meiotic abnormalities							
		Monad	Dyad	Triad	Tetrad		Pentad	Hexad	Heptad
					Normal	Abnormal			
1	100	1.0	3.0	1.0	20.0	56.0	15.0	4.0	-
2	110	0.9	-	0.9	22.2	75.1	0.9	-	-
4	240	-	0.4	2.9	18.7	77.2	0.8	-	-
5	148	-	-	-	19.0	80.3	-	-	0.7
8	154	-	-	4.5	11.3	81.6	2.6	-	-
9	129	-	-	6.9	5.4	86.9	0.8	-	-
13	90	-	-	4.5	7.8	87.7	-	-	-
16	72	-	-	-	1.4	98.6	-	-	-

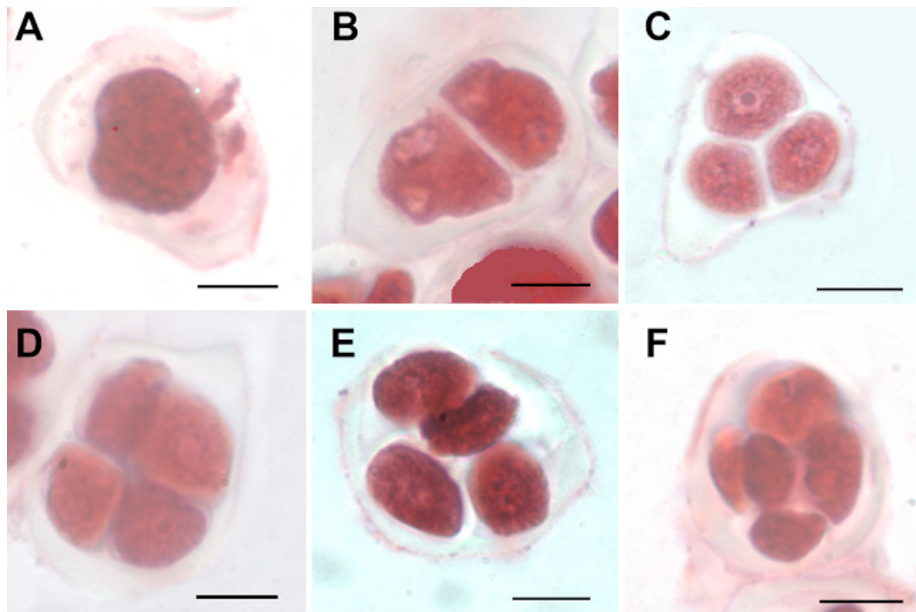


Figure 4. Abnormalities at the tetrad stage of meiosis in *S. chacoense* population APEC-2 from southeastern Buenos Aires province. Monad (A), dyad (B), triad (C), normal tetrad (D), abnormal tetrad (E), pentad (F). Bars=10 μ m.

Table 5. Pollen-pistil relations within and between morphological groups (G) in *S. chacoense* population APEC-1. Inhibition of pollen tube growth in stigma (S) and style (St). Inhibition sites: 1/3, 2/3, 3/3. C: compatible.

♂	G1			G2			G3		G4	G5		G6						
	1	2	3	5	7	10	11	13	14	15	17	19	21	22	23	24	25	26
G1	1				S; St 1/3													
	2								C									
	3	C																
G2	5								S; St 1/3									
	7									St 1/3								S; St 1/3
	10					S; St 1/3												
	11												C					S; St 1/3
	13																	
G3	14																	S; St 1/3
	15	C							S					c				
G4	17									St 3/3	St 3/3	St 1/3						S; St 1/3
G5	19																	
G6	21										St 2/3							
	22									C	C							St 1/3
G7	23																	
	24																	S; St 1/3
	25										St 1/3							
G8	26																	

Table 6. Pollen-pistil relations within and between morphological groups (G) in *S. chacoense* population APEC-2. Inhibition of pollen tube growth in stigma (S) and style (St). Inhibition sites: 1/3, 2/3, 3/3. C: compatible.

♀	♂	G1				G2		G3	G5				G6	G7	
		1	2	3	4	8	10	13	15	16	17	18	20	21	22
G1	1														
	2											C			
	3				S										
	4													C	C
G2	8	S		St 1/3, 2/3						St 1/3	St 3/3				
	10														C
G3	13													C	
G5	15											C			C
	16													C	
	17			C											C
	18			S											St 3/3
G6	20														
G7	21				S; St 1/3	C							S; St 3/3		C
	22	S; St 3/3		C											S; S 3/3

Table 7. Pollen-pistil relations within and between morphological groups (G) in *S. chacoense* population APEC-3. Inhibition of pollen tube growth in stigma (S) and last third of the style (3/3 St).

♀	♂	G1				G2			G3		G4		G5		G6		G7	
		1	2	3	4	8	9	10	11	14	17	19	20	22	23	24	26	28
G1	1			s														
	2									s								
	3																	
	4																	
G2	8											s						
	9																	s
	10														s			
G3	11																	
	14								s									
G4	17	s								s						s		
	19																	
G5	20																	
	22												s					s
G6	23																	
	24																	
G7	26				St 3/3													
	28																	

DISCUSSION

In Argentina, *S. chacoense* has a wide distribution, from the northwestern region, where it grows at high altitudes (up to 2000 m) to the northeastern and central regions, where it grows at low altitudes (below 1000 m, including sea level) in various and, sometimes, contrasting environments. This taxonomic species exhibits significant morphological variation throughout its range, in which natural populations largely overlap with other wild and cultivated potatoes (Hawkes and Hjerting, 1969; Erazzú *et al.*, 2009; Okada 1979, pers. comm.). This morphological variation could be the result of adaptation to various macro and micro-environments (possibly underlied by physiological and/or genetic causes) and/or the occurrence of hybridization and introgression processes. The occurrence of the latter phenomena was demonstrated by Bedonni and Camadro (2009) in their morphological, genetic and molecular

study with accessions of *S. kurtzianum* Bitt. *et* Wittm. and of *S. chacoense* and other wild diploids that overlap in their distribution in the west-central region of Argentina, and by Larrosa *et al.* (2012), who reported that populations classified as *S. chacoense* from the northwestern and southeastern regions of Argentina had low pollen fertility, underlied by abnormalities at the tetrad stage of meiosis, that closely resembled the observed in artificial and natural presumed hybrids (according to the intermediacy of morphological phenotypes), as will be discussed shortly.

The southeastern region of Buenos Aires province is climatically subhumid-humid. The annual rainfall average is 800 mm, with maximum values from January to March and minimum from June to August. Minimum and maximum daily temperatures, as well as thermal amplitudes, show seasonal changes, with lower values registered between June and August, and higher values between December

and March. The annual average temperature reaches around 13.3° C. The only other wild potato reported for the area is *S. commersonii* Dun. ($2n=2x=24$; 1EBN) which spontaneously grow in hillsides and grasslands, although “escapes” of other wild potato species from experimental investigations –carried out by other research groups more than 30 years ago in the grounds of the Experimental Station– cannot be discarded.

In the three studied populations, flower colour and flower arrangement in inflorescences were consistent over populations. However, morphological variation was observed for leaf characters, corolla shape and fruit colour.

As described by Hawkes and Hjerting (1969), the taxonomic species *S. chacoense* has leaves arranged in semi-rosettes at the base of the stem, with 4–6 pairs of lateral leaflets and one terminal leaflet, and 0–3 pairs of interjected leaflets, with leaf shape being either ovate, lanceolate or elliptic. Inflorescences consist of many (on average 3–5) flowers, with white and stellate corollas. Fruit shape can be either spherical or ovate, varying in colour from smooth green to green with rough white spots or smooth purple spots.

The three populations fall into the formal description for the evaluated leaf and fruit characters. However, they varied extensively within and between them in corolla shape, which was very stellate to stellate and semi-rotated, actinomorphic in two of them and frequently zygomorphic in the third (APEC 3). In this regard, Hawkes and Hjerting (1969) considered that *S. chacoense* (included in the Commersoniana taxonomic series along with *S. commersonii* on the basis of corolla stellate) is closely related to species in series Tuberosa, which includes the cultivated and various wild diploid and tetraploid potatoes with which it can form hybrids. In fact, they considered that *S. chacoense* is not so closely related to *S. commersonii* as revealed by the difficulties involved in their hybridization, both in nature and in field experiments. A similar observation on the evolutive divergence between the two taxonomic species was made by Summers and Grun (1981) based on the results of controlled interspecific crosses. However, hybridization between *S. chacoense* and *S. commersonii* may occur in nature, giving origin to $3x$ hybrids by functioning of $2n$ gametes from the latter, that would allow the circumvention of the post-zygotic endosperm barrier in the inter-EBN cross. Moreover, Raimondi *et al.* (2003) obtained hybrid seeds in interspecific crosses among accessions of *S. chacoense*, *S. kurtzianum* and other wild

potatoes from southern Mendoza (tentatively classified as *S. ruiz-lealii* Brücher), despite the fact that hybridization barriers were detected in some genotypic combinations.

In the present study, the percentage of pollen viability varied both within and between populations, similarly to the reported by Erazzú *et al.* (1999) in nine accessions of diploid *S. spagazzinii* Bitter from northwestern Argentina, which had been previously assigned to three morphological groups by Ispizúa (1994). Similarly, Clausen *et al.* (2006) reported variations in plant morphology, chromosome number, pollen fertility and $2n$ pollen production in 12 accessions classified as *S. infundibuliforme* Philippi from northwestern Argentina, which is indicative of the presence of hybrids. More recently, Larrosa *et al.* (2012) carried out studies of pollen viability in artificial hybrids between wild diploid species and the common potato (*S. gourlayi* Hawkes x *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), and accessions and samples of spontaneous wild populations from northwestern Argentina classified as “species” (*S. chacoense* or “presumed hybrids” (*S. gourlayi* x *S. infundibuliforme*)). They reported high variability for pollen fertility and sterility in all of them, regardless of their origin and taxonomic status.

We detected variability for pollen size ($<n$, n , $2n$, $>2n$ and $4n$) and frequency, within and between populations, with the highest frequencies being for the $2n$ class in two of them and the $<n$ class in the third. The unexpected products at the tetrad stage of meiosis in individual plants of APEC-2 suggest abnormalities in spindle orientation (tripolar, parallel, fused) in Anaphase II that would explain the formation of heterogeneous size pollen. In the two remaining populations, APEC-1 and APEC-3, meiosis was not analyzed because only open flowers were present at sampling time, although it is possible that similar abnormalities occurred in them as well. Similar observations were reported by Camadro *et al.* (2008) in accessions of the wild diploid taxonomic potato species *S. okadae* Hawkes and Hjerting from northwestern Argentina and Bolivia. These authors detected plants with heterogeneous size pollen and dyads and triads, as well as normal tetrads, at the tetrad stage as a result of abnormal Anaphase II spindle orientation. Moreover, Larrosa *et al.* (2012) observed $2n$ and $4n$ pollen in addition to normal (n) pollen, high male sterility and various abnormalities at the tetrad stage of meiosis in the hybrids and populations previously described.

In nature, wild potato populations are isolated by external and/or internal hybridization barriers (Camadro

et al., 2004). However, as Camadro *et al.* (2012) have discussed, the internal barriers can be incomplete, providing opportunities for hybridization and introgression within and between populations and ploidy levels in areas of overlap.

The results of the controlled crosses within *S. chacoense* populations carried out in the present study provide evidence of the functioning of reproductive isolation barriers at the pollen-stigma/style level, at various sites, in the three populations. However, fully compatible genotypic combinations were also detected in APEC-1 and APEC-2.

It may be speculated that in those genotypic combinations in which pollen tube growth is inhibited in the 1/3 of the style, as in some of the genotypic combinations analyzed within APEC-1 and APEC-2, both gametophytic self-incompatibility and crossed incompatibility could be occurring. On the contrary, in APEC-3 population, only cross incompatibility occurred since the inhibition sites were the stigma and the last third of the style. Similar results were obtained by Erazzú *et al.* (1999) in the accessions of diploid *S. spagazzinii* previously mentioned. Different sites of pollen-pistil/style incompatibility were observed in controlled crosses between and within morphological groups. These authors speculated that both variability for morphological phenotypes and site of expression of the incompatibility reaction could be the result of spontaneous interspecific crosses in nature.

The variability for morphological phenotypes of leaves, flowers and fruits, pollen viability, pollen size (n , $2n$, $>2n$, $4n$) and frequency, and abnormalities at the tetrad stage of meiosis observed in this study are indicative of a possible hybrid origin of the three populations. Since it was first described by Hassler (1911) under the name of *Solanum guaraniticum* and assigned the actual name *S. chacoense* by Bitter in 1912 (in Hawkes and Hjerting 1969), population samples were collected from many parts of its distribution range, but mainly in Buenos Aires and Tucumán provinces (Central and NW Argentina, respectively) and referred to a number of “very unrelated species”. Hawkes and Hjerting (1969) considered that eleven microspecies and one botanical variety described by various other authors had to be grouped under the name of *S. chacoense*. In our research group, and working with spontaneous populations that fall into the formal description of the species, we have observed neither normal meiosis nor high pollen fertility (see Larrosa *et al.*, 2012) as it would be expected for a “pure” species with sexual reproduction. Thus, we

have proposed that *S. chacoense* and other spontaneous wild potato populations are at various stages of evolutive divergence (see Camadro *et al.*, 2012).

The results of the present study, similar to those previously obtained in the Laboratory of Genetics (EEA Balcarce, INTA) with artificial and spontaneous hybrids, and accessions with specific categories from germoplasm banks, as has been previously discussed, provide further evidence on the role of spontaneous hybridization in wild potatoes populations. They also raised the concern, and poise the need to investigate, other natural populations from a wide geographic area in Argentina which have been classified as *S. chacoense*, given the genetic consequences of the classification approach in germplasm conservation and breeding.

REFERENCES

- Bedonni M.C., Camadro E.L. (2009) Morphological and molecular evidence of natural interspecific hybridization in the diploid potato *Solanum kurtzianum* from Argentina. *Botany* 87: 78-87.
- Camadro E.L., Carputo D., Peloquin S.J. (2004) Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear cytoplasmic male sterility and endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1369-1376.
- Camadro E.L., Erazzú L.E., Maune J.F., Bedogni M.C. (2012) A genetic approach to the species problems in wild potato. *Plant Biol.* 14: 543-554.
- Camadro E.L., Peloquin S.J. (1980) The occurrence and frequency of $2n$ pollen in three diploid *Solanums* from northwest Argentina. *Theor. Appl. Genet.* 56: 11-15.
- Camadro E.L., Saffarano S.K., Espinillo J.C., Castro M., Simon P.W. (2008) Cytological mechanisms of $2n$ pollen formation in the wild potato *Solanum okadae* and pollen-pistil relations with the cultivated potato. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55: 471-477.
- Carputo D., Frusciante L., Peloquin S.J. (2003) The role of $2n$ gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing *Solanums*. *Genetics* 163: 287-294.

- Clausen A.M., Ispizúa V.N., Camadro E.L., Larrosa F. (2006) Morphological and genetic variability in wild potato species from Northwest Argentina. 90th Annual Meeting Potato Association of America, VI International Solanaceae Conference and Solanaceae Genomics Network. Madison, WI, USA, pp. 165.
- Correll D.S. (1962) The potato and its wild relatives. Texas Research Foundation, Renner, Texas, USA.
- Den Nijs T.P.M., Peloquin S.J. (1977) 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. *Euphytica* 26: 585-600.
- Erazzú L.E., Camadro E.L., Clausen A.M. (1999) Pollen–style compatibility relations in natural populations of *Solanum spegazzinii* Bitt. *Euphytica* 105: 219-227.
- Erazzú L.E., Camadro E.L., Clausen A.M. (2009) Persistence over time, overlapping distribution and molecular indications of interspecific hybridization in wild potato populations of Northwest Argentina. *Euphytica* 168: 249-262.
- Geerts P., Toussaint A., Mergeai G., Baudoin J.P. (2002) Study of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6: 109-119.
- Hadley H.H., Openshaw S.J. (1988) Interspecific and Intergeneric Hybridization. In Fehr W.R., Hadleys H.H. (Eds.) *Hybridization of Crop Plants*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 133-159.
- Hawkes J.G. (1963) A revision of the tuber-bearing Solanums, 2nd edn. Scottish Plant Breeding Station Records. Pentlandfield, UK, pp. 76-181.
- Hawkes J.G., Hjerting J.P. (1969) The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ispizúa V.N. (1994) *Solanum spegazzinii* Bitt: variabilidad intraespecífica y su relación con especies afines. Trabajo de graduación Ing. Agr., FCA, UNMdP, Balcarce, Argentina.
- Jansky S.H., Dempewolf H., Camadro E.L. (2013) A case for crop wild relative preservation and utilization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Crop Sci.* 53: 746-754.
- Johnston S.A., Den Nijs T.P.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E.Jr. (1980) The significance of genetic balance to endosperm development in interespecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 53: 262-269.
- Larrosa F.H., Maune J.F., Erazzú L.E., Camadro E.L. (2012) Meiotic abnormalities underlying male sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biol.* 14: 223-233.
- Love S.L., Pavek J.J., Thompson-Johns A., Bohl W. (1998) Breeding progress for potato chip quality in North American cultivars. *Am. J. Potato Res.* 75: 27-36.
- Martin F.W. (1958) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34: 125-128.
- Masuelli R.W., Camadro E.L. (1997) Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica* 94: 227-235.
- Masuelli R.W., Camadro E.L., Erazzú L.E., Bedogni M.C., Marfil C.F. (2009) Homoploid hybridization in the origin and evolution of wild diploid potato species. *Plant Syst. Evol.* 277: 143-151.
- Mok D.W.S., Peloquin S.J. (1975) Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 217-225.
- Okada K.A., Clausen A.M. (1982) Natural hybridization between *Solanum acaule* Bitt. and *S. megistacrolobum* Bitt. in the province of Jujuy, Argentina. *Euphytica* 31: 817-835.
- Peloquin S.J., Boiteux L.S., Carputo D. (1999) Meiotic Mutants in Potato: Valuable Variants. *Genetics* 153: 1493-1499.
- Raimondi J.P., Sala R.G., Camadro E.L. (2003) Crossability relationships among the wild diploid

- potato species *Solanum kurtzianum*, *S. chacoense* and *S. Ruiz-lealii* from Argentina. *Euphytica* 132: 287-295.
- Ross H. (1986) Potato breeding - problems and perspectives supplement. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany.
- Summers D., Grun P. (1981) Reproduction isolation barriers to gene exchange between *Solanum chacoense* and *Solanum commersonii* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 68: 1240-1248.
- Takayama S., Isogai A. (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-89.
- Ugent D. (1966) Hybrid weed complexes in *Solanum*, section *Tuberarium*. PhD. thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA.
- Veilleux R.E., McHale N.A., Lauer F.I. (1982) 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canad. J. Genet. Cytol.* 24: 301-314.
- Watanabe K., Peloquin S.J. (1991) The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theor. Appl. Genet.*

PRINCIPAL COMPONENTS IN ASSOCIATIVE MAPPING

COMPONENTES PRINCIPALES EN MAPEO ASOCIATIVO

Peña Malavera A.¹, Gutierrez L.², Balzarini M.¹

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Valparaíso s/n, Ciudad Universitaria, CP: 5000 (509) Córdoba, Argentina.

² Facultad de Agronomía, Universidad de la República

mbalzari@agro.unc.edu.ar

ABSTRACT

Association mapping (or linkage disequilibrium mapping) is used to find specific parts of the genome associated with phenotypic trait variation. It is a widely used in plant breeding because it allows the use of populations that do not come from specific experimental designs. If the population of individuals used in association mapping is genetically structured, the number of false positives, in the marker-trait association, increases. Several strategies can be used to model associations taken into account the underlying genetic structure. The principal components analysis can be used to identify the structure and express it in a reduced number of principal components (PCs). Then, these PCs can be incorporated as covariates in the association model. Different models strategies can be used to account for genetic structure in association mapping. The aim of this paper is to estimate expected false positive rates in association mapping performed by three different statistical models, under genetically structured populations. Compared models were M1: without correction for structure, M2: including PCs, as covariates of fixed effects, and M3: including PCs as random effects within a linear mixed model. Model comparison was performed using both, real and simulated data, for self-pollinated specie. The results suggested that the use of PCs as random covariates decreases the false positive rate in the inference of marker-trait associations

Key words: Mixed linear models, Principal components analysis, Genetic structure

RESUMEN

El mapeo asociativo (o mapeo por desequilibrio de ligamiento) permite encontrar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico. Es una práctica difundida en el mejoramiento de especies vegetales ya que no necesita la utilización de poblaciones provenientes de cruzamientos controlados. Sin embargo, se ha detectado que en poblaciones estructuradas genéticamente, el número de falsos positivos en la asociación marcador-carácter puede aumentar significativamente. El análisis de componentes principales constituye una herramienta para identificar la estructura y expresar la misma en un número reducido de componentes principales (CPs). Entonces, estos CPs se pueden incorporar como covariables en el modelo de asociación. Diferentes estrategias de modelado se pueden utilizar para tener en cuenta la estructura genética en el mapeo de asociación. El objetivo de este trabajo fue estimar las tasas de falsos positivos derivados de la aplicación de tres modelos estadísticos diferentes de mapeo bajo poblaciones estructuradas. Los modelos comparados fueron M1: sin corrección por estructura, M2: con las CPs como covariables de efectos fijos y M3: incluyendo las mismas CPs como covariables de efectos aleatorios en el marco de un modelo lineal mixto. La comparación se realizó usando datos reales y simulados de una especie autógama. Los resultados sugieren que la corrección con las CPs como covariables aleatorias disminuye la tasa de falsos positivos en la inferencia de asociaciones marcador-carácter.

Palabras clave: Modelos lineales mixtos, Análisis de componentes principales, Estructura genética

Fecha de recepción: 09/06/2014
Fecha de aceptación de versión final: 25/06/2014

INTRODUCCIÓN

El mapeo asociativo, también conocido como mapeo por desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*, LD), permite identificar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico de interés. La técnica nace en el contexto del estudio de enfermedades en humanos por la imposibilidad de desarrollar poblaciones provenientes de cruzamientos controlados (Corder, 1994). En los últimos años se ha incrementado su uso para la identificación de genes responsables de características complejas de interés agronómico y actualmente esta práctica se encuentra difundida y adoptada en el mejoramiento de especies vegetales para el análisis de los *loci* involucrados con caracteres cuantitativos (QTL) (Remington *et al.*, 2001; Kraakman *et al.*, 2006; Aranzana *et al.*, 2005; Bressanello y Sorrells, 2006; D'hoop *et al.*, 2008; Stich *et al.*, 2008; Thornsberry *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2008).

El LD puede definirse como el grado de asociación no aleatoria entre alelos de distintos *loci* en poblaciones de individuos no relacionados (Yu y Buckler, 2006); se relaciona con la proporción de gametos que no segregan al azar y provee información sobre la historia de la población así como sobre el sistema de selección implementado. A nivel genómico, refleja el impacto de fuerzas evolutivas (selección natural, mutación y migración) que causan cambios en las frecuencias génicas (Lynch y Walsh, 1998; Falconer y Mackay, 1996).

Cuando la población de individuos empleada en el mapeo por LD está estructurada genéticamente, aumenta la cantidad de falsos positivos en la detección de las asociaciones de interés (Malosetti *et al.*, 2007). Esto ocurre porque en una población con sub-poblaciones, cualquier carácter presente con mayor frecuencia en una de ellas mostrará asociación positiva con alelos que son más comunes en esta sub-población (Zhang *et al.*, 2010). Consecuentemente, es posible que se detecten marcadores asociados con la composición de la población más que con la característica de interés (Yu *et al.*, 2006). Esta situación aumenta la tasa de falsos positivos. Por ello, se han propuesto distintas estrategias de mapeo asociativo tendientes a controlar el aumento en la detección de asociaciones espurias. Una estrategia es incluir en el modelado, covariables que representen la estructura genética.

Una forma de estudiar la estructura subyacente es estimar la probabilidad de pertenencia de cada individuo a las sub-poblaciones que componen la meta-población (Pritchard *et al.*, 2000). La información de la clasificación

resultante se puede incorporar al modelo de mapeo de distintas formas (Yu *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2011). Price *et al.* (2006) proponen contemplar la estructura genética a través de una matriz compuesta por variables sintéticas resultantes de un análisis de componentes principales (ACP) (Hottelling, 1936) realizado sobre la matriz de datos de marcadores genéticos. El ACP es una técnica de reducción de dimensión, ampliamente usada en diversas áreas de la biología e implementada en la mayoría de los programas estadísticos. Con el ACP es posible obtener un conjunto de nuevas variables, generadas como combinación lineal de las variables originales. Estas variables sintéticas o componentes principales (CPs) tienen la característica de ser no correlacionadas y óptimas para señalar variabilidad o diferencias entre los casos en estudio. Las CPs, conformadas a través de la combinación de marcadores moleculares de los genotipos de la población de mapeo permiten señalar diferencias entre genotipos causadas por la existencia de estructuración genética. Así las CPs significativas, según la prueba de Tracy y Widom (1994), han sido usadas como covariables en el modelo de mapeo asociativo (regresión lineal múltiple) (Wang *et al.*, 2012; Cappa *et al.*, 2013; Muñoz-Amatriaín *et al.*, 2014). Tales covariables pueden contemplarse en el modelo de mapeo como efectos fijos o aleatorios, para este último caso la estimación se realizó en el contexto de un modelo lineal mixto (MLM) (Searle, 2008). Malosetti *et al.* (2007) recomiendan incluir la estructura genética subyacente en las poblaciones de mapeo como efecto aleatorio, independientemente del procedimiento utilizado para detectar dicha estructura y del nivel de LD subyacente. Sin embargo, no se conoce si tal recomendación se extiende a casos donde existan bajos o casi nulos niveles de ligamiento como sucede en colecciones de germoplasma de especies autóгамas genotipadas con cantidades relativamente bajas de marcadores. El objetivo de este trabajo fue comparar el desempeño, a nivel de las tasas de falsos positivos, de tres modelos biométricos de mapeo asociativo bajo escenarios de baja estructuración genética y sin el uso de alta densidad de marcadores. Los modelos comparados fueron: uno que no incluye corrección por estructura genética (M1) y dos que consideran componentes principales (CPs) para representar estructura. De éstos, uno incorpora la estructura a través de CPs en un modelo lineal de efectos fijos (M2) y otro trata a la CPs como componentes aleatorias en un modelo lineal mixto (M3). La comparación se realizó sobre bases de datos reales y simulados de cebada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos

Los datos analizados son de un programa de mejoramiento de cebada y comprenden 179 genotipos y 811 marcadores moleculares del tipo *Diversity Array Technology* (DArT®) (Comadran *et al.*, 2009). Los datos simulados consideraron 2.100 marcadores moleculares y la presencia de estructura genética dada por la existencia de tres sub-poblaciones. Para la simulación se usó el *software Easypop* (Balloux, 2001) con la siguiente asignación de parámetros: sub-poblaciones sin cruzamientos aleatorios entre ellas, proporción clonal igual a cero, coeficientes de autofecundación igual a uno, modelo de migración de islas jerárquico, proporción de migración dentro de grupos igual a cero y proporción de migración entre grupos 0,1 y 0,3; tasa de recombinación entre *loci* de 0,03 y tasa de mutación igual a cero. Sobre los genotipos simulados se seleccionaron aleatoriamente diez marcadores de la matriz genética y en base a sus posiciones se generaron fenotipos distribuidos normalmente ($\mu = 10, \sigma^2 = 15$). La simulación implementada permitió conocer la ubicación de los marcadores que influyen en la expresión del fenotipo. Los marcadores seleccionados que se encontraban dentro en una ventana de 10 cM, fueron interpretados como QTL. Otros trabajos en cebada han usado la misma amplitud de ventana en la identificación de QTL (Comadran *et al.*, 2009; von Zitzewitz *et al.*, 2011). Cada simulación fue repetida 30 veces.

Modelos de mapeo asociativo

Se emplearon tres modelos de mapeo asociativo para evaluar el efecto del marcador sobre el fenotipo, M1: sin corregir por estructura genética poblacional y otros dos corrigiendo por estructura genética en las siguientes aproximaciones, M2: que utilizó como covariables los ejes significativos según TW de un ACP en un modelo lineal de efectos fijos y M3 que utilizó los mismos CPs como covariables en la porción aleatoria de un modelo lineal mixto:

$$Y_i = X\beta + Pv + \varepsilon_i$$

donde Y_i es el vector de valores fenotípicos, X es la matriz de datos de los marcadores moleculares, β es el vector de efectos alélicos a estimar, P es la matriz de estructura genética (componentes principales), v es el vector de efectos de la estructura poblacional y ε_i es el vector de términos de error aleatorio.

Cuando se contrastaron las hipótesis los valores p fueron corregidos por multiplicidad según la propuesta de Benjamini y Hochberg (1995). El desempeño de los modelos se evaluó usando como criterio la proporción de falsos positivos (FP) y la proporción de falsos negativos (FN) obtenidas a través del conteo de asociaciones falsas detectadas como significativas (FP) o asociaciones no detectadas (FN) en cada simulación y promediando luego sobre las 30 simulaciones realizadas. Los análisis fueron realizados mediante *Info-Gen* (Balzarini y Di Rienzo, 2004) y su interfaz con R (R Development Core Team, 2013). El código para el ajuste de estos modelos de mapeo asociativo se presenta en *Info-Gen*, el cual invoca desde la interfaz mencionada los *scripts* desarrollados por Gutiérrez (2011).

RESULTADOS

Tanto con los datos reales como con los simulados los niveles de correlación entre marcadores fueron generalmente bajos. En la Figura 1 se presenta el *heat map* de los datos genéticos reales. En este gráfico se colorea cada asociación entre un par de marcadores según la magnitud de la misma. Los puntos más calientes (rojos) no son muchos y no se observa un patrón de asociación, sólo algunas correlaciones (0,26%) fueron mayores a 0,6.

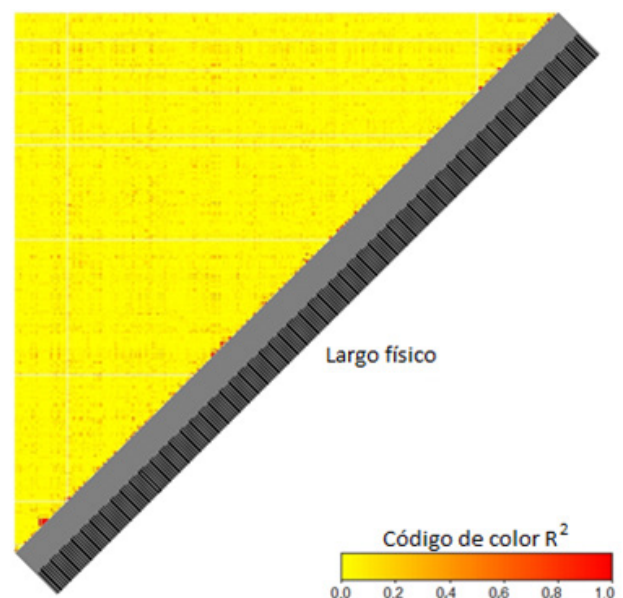


Figura 1. *Heat map* de medidas de desequilibrio de ligamiento entre pares de marcadores (811 DArT).

El ACP realizado sobre de datos de marcadores, sugiere que ésta puede identificarse con 17 combinaciones lineales (CPs). En la Figura 2a se muestra la proporción de varianza explicada por cada CP. El estadístico de Tracy-Widom (TW) retuvo estos primeros 17 ejes como estadísticamente significativos; las cinco primeras componentes resumían el 40% de la variabilidad total. Para los datos simulados, TW

requirió aún más ejes para resumir la estructura (41 ejes), siendo esa cantidad la necesaria para explicar un 60% de la variabilidad genética (Figura 2b). Estos resultados del estudio de la estructura genética, sugieren que la divergencia genética entre las subpoblaciones de datos reales es mayor que en la de datos simulados donde el estadístico F_{st} tuvo un valor relativamente bajo (0,01).

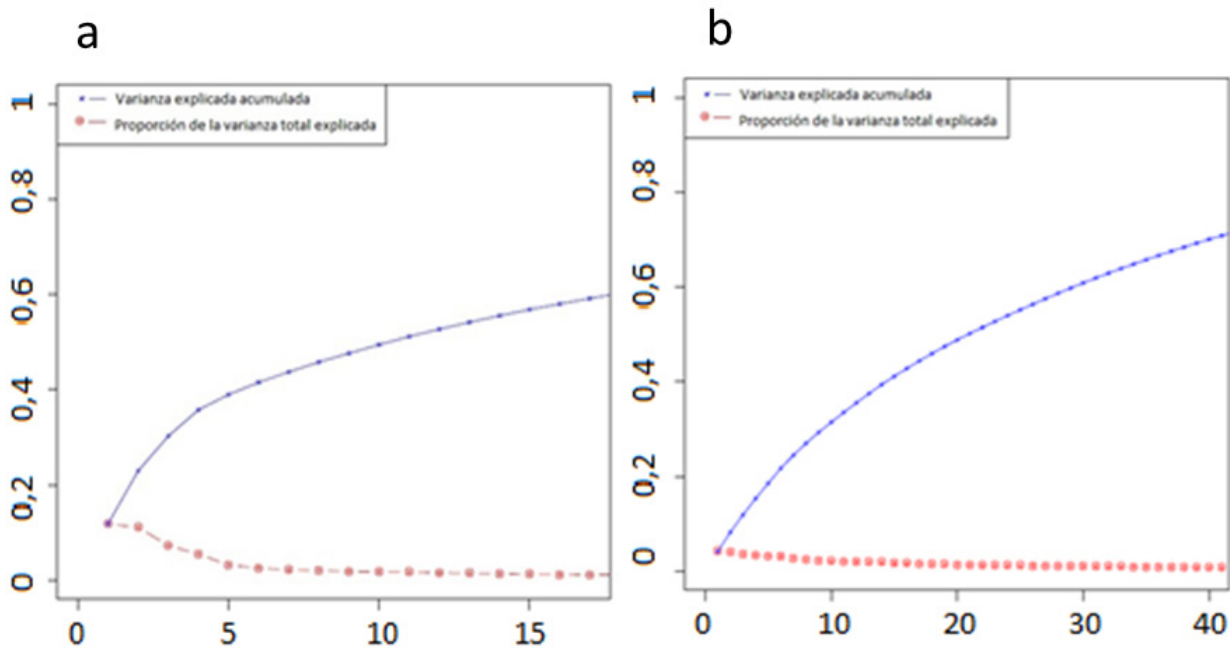


Figura 2a y 2b. Proporción total de varianza explicada por los ejes significativos según el estadístico de Tracy-Widom y varianza explicada acumulada a la izquierda para los datos reales y a la derecha para una de las realizaciones de los datos simulados.

La variabilidad fenotípica encontrada en los datos reales de cebada representó un 11% respecto a la media del rendimiento para los datos reales. Se detectaron marcadores significativos usando los valores máximos de $-\log_{10}$ (valor p) donde valor p es el nivel de significancia real asociado a la prueba de hipótesis de asociación nula entre un marcador y el carácter fenotípico. El valor umbral fue de tres, es decir que aquellos marcadores donde la transformación logarítmica es superior a tres son identificados como estadísticamente significativos o ligados a un QTL.

Para los datos reales, el modelo sin corrección por estructura y el modelo M2 mostraron valores máximos del estadístico $-\log_{10}$ (valor p) mayores a los observados en el modelo M3. Los valores p asociados a las pruebas de hipótesis bajo M3 fueron mayores, entendiéndose con menor significancia. Al asignar un valor umbral de tres, es decir identificando como significativos aquellas asociaciones con

un valor P menor a 0,001, ningún QTL fue detectado en la base de datos reales, mientras que para M1 y M2 la cantidad de marcadores significativos para el mismo valor umbral aumentó de manera considerable. Estos resultados muestran que el modelo M3 es más conservador que los otros dos, presentando menor tasa de FP.

En la Figura 3 se presenta la significancia de cada marcador analizado bajo los diferentes modelos en datos reales (arriba) y en datos simulados (abajo); los valores altos (mayores al umbral propuesto) sugieren la presencia de un potencial QTL. Los resultados sugieren que la inclusión de la estructura a través de las componentes principales en el modelo como efecto aleatorio produjo mayor control sobre la tasa de falsos positivos, *i.e.* se detectaron menor cantidad de FP. El M3 indicó que no existían QTL para el rendimiento.

En los datos simulados se observó también una reducción del estadístico $-\log_{10}(\text{valor } p)$ en el modelo con CPs aleatorias. El modelo que usó las CPs como efectos fijos incrementó los valores de este estadístico y, consecuentemente, la tasa de falsos positivos, incluso más que aquel sin corrección por estructura.

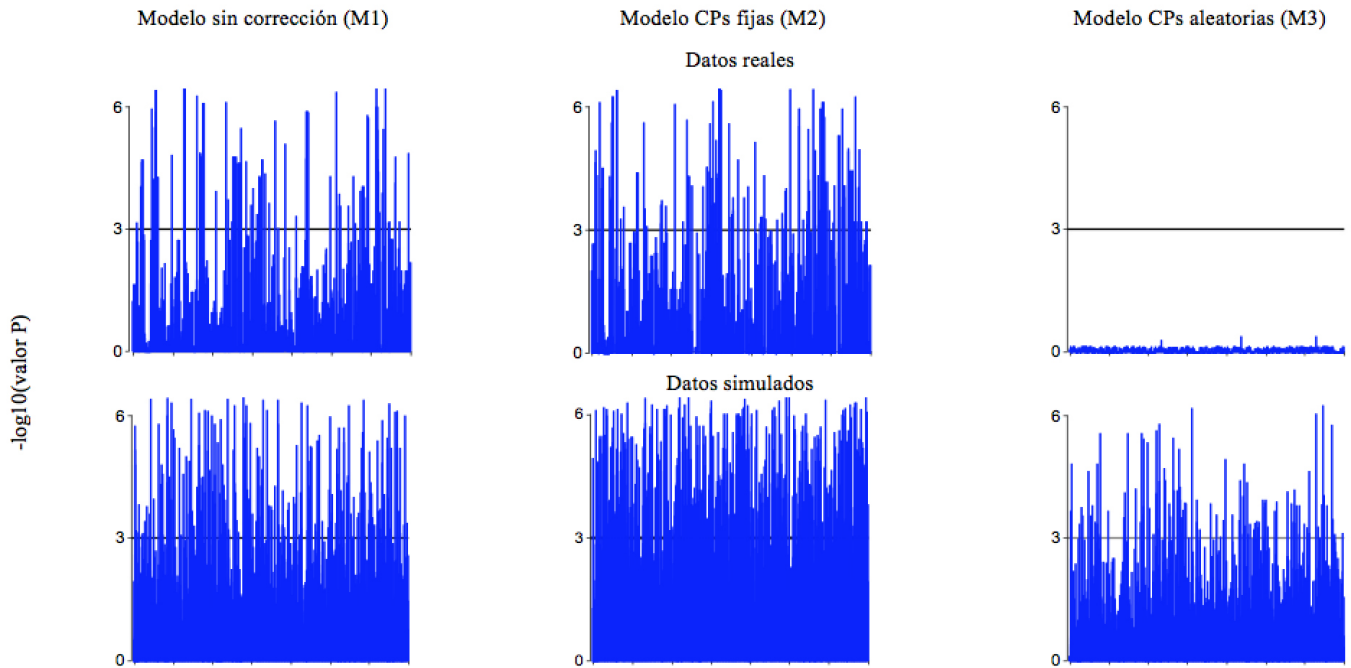


Figura 3. Perfil de significancias para tres modelos de mapeo asociativo en datos reales (arriba) y $-\log_{10}(\text{valor } p)$. (abajo), en el eje de las abscisas se representan los marcadores y en las ordenadas el estadístico

En la Tabla 1 se muestra la proporción de falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) para los tres modelos evaluados. Se observa que la corrección por estructura incluyendo CPs como efecto aleatorio produce una disminución de las tasas de FP.

Tabla 1. Tasa de falsos positivos y de falsos negativos para tres modelos de mapeo asociativo.

Modelo	Falsos Positivos	Falsos Negativos
M1	0,34	0,65
M2	0,54	0,45
M3	0,24	0,74

M1: sin corrección por estructura, M2: con corrección mediante CPs como covariables de efectos fijos y M3: con corrección mediante CPs como covariables de efectos aleatorios.

Para la comparación de modelos se usó también la función de distribución acumulada de los valores P resultantes de las pruebas de hipótesis sin corrección por multiplicidad. En la Figura 4 se muestra la función de distribución empírica para los valores P de cada modelo para datos reales (izquierda) y simulados (derecha). Tanto para los datos reales como para los simulados, basados en

la distribución de los valores P, el modelo sin corrección por estructura y el que introduce las componentes principales como efecto fijo, no se desempeñaron bien. Para ambos se observa una distribución asimétrica hacia valores P pequeños, es decir, mayor significancia de la esperada (*i.e.* mayor tasa de FP).

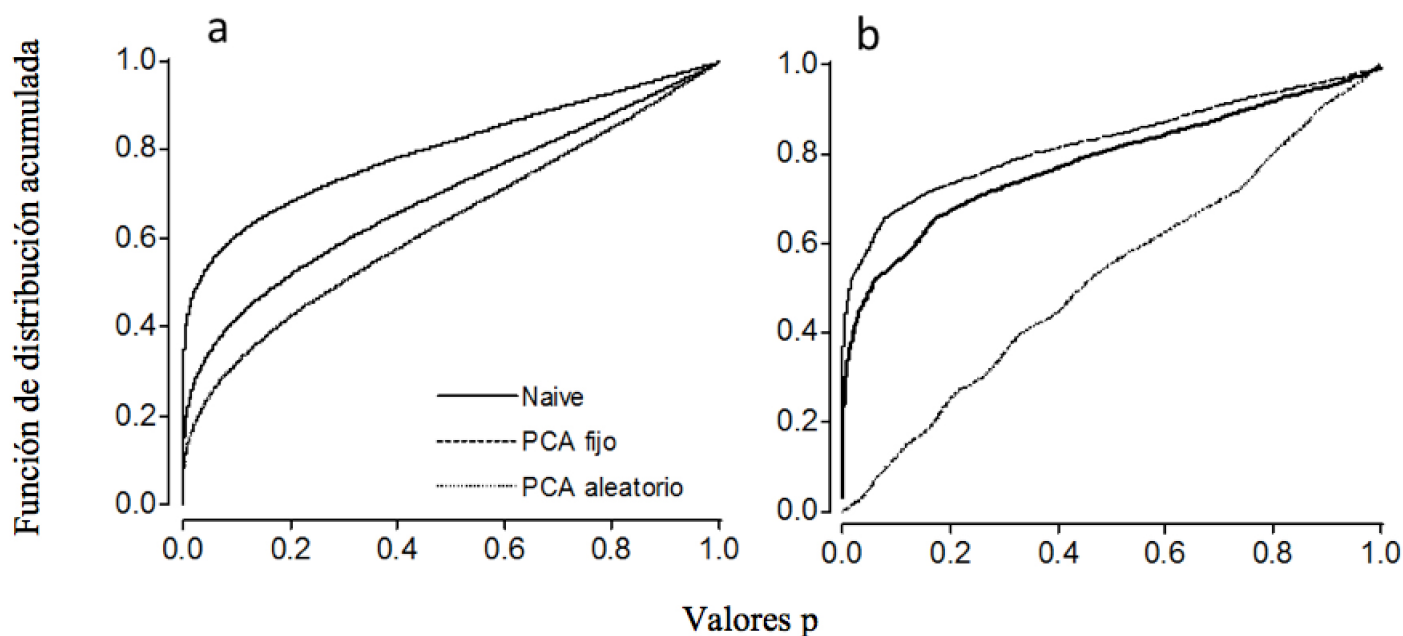


Figura 4. Función de distribución acumulada de los valores P para datos reales (a) y simulados (b).

DISCUSIÓN

El mapeo asociativo o mapeo por LD se usa para detectar asociaciones entre caracteres cuantitativos y marcadores moleculares (Melchinger *et al.*, 1998). A diferencia del análisis de QTL clásico el cual requiere la generación de poblaciones de mapeo, tales como F_2 , retrocruzas y/o dobles haploides (Bonamico *et al.*, 2010), el mapeo por LD puede llevarse a cabo con poblaciones de líneas de fácil obtención por ejemplo colecciones de germoplasma. Sin embargo, el número limitado de eventos de recombinación que pueden acumular estas poblaciones de mapeo, podría resultar en una baja resolución para la detección de QTL. El número de alelos por *locus* en la población de mapeo puede ser chico en relación a la diversidad genética disponible para las especies y, por tanto, el contenido de información sería bajo. Una forma de tratar este problema

es aumentar el número de *loci* en estudio. Mientras más denso es el genotipado, más desequilibrio de ligamiento o correlación entre los marcadores se espera encontrar.

Además, el LD también está asociado a la historia de recombinación de las poblaciones. En autógamias, con poblaciones genotipadas por menos de 1.000 marcadores, el LD puede no ser alto y este hecho puede afectar la detección de marcadores significativos o ligados a los *loci* de interés. En el conjunto de datos de cebada usado en este trabajo, el LD fue bajo ($r^2 < 0,20$). Kraakman *et al.* (2006) estudiaron el LD en poblaciones de cebada y concluyeron que puede existir LD hasta intervalos de 10 cM entre marcadores, pero también con valores bajos. Francia *et al.* (2004) y von Zitzewitz *et al.* (2011) en el mismo cultivo informaron QTL pertenecientes a dos grupos de LD en un mismo cromosoma.

Respecto a los modelos de mapeo asociativo en autógamias, Gutiérrez *et al.* (2011) y Wang *et al.* (2012) probaron métodos de corrección de la estructura poblacional, incluyendo entre ellos no solo al modelo con CPs aleatorias sino también al modelo que incorpora como covariables a la matriz de salida del *software STRUCTURE* (Pritchard *et al.*, 2000). Los resultados mostraron comportamientos similares entre estas dos últimas estrategias. Los autores destacaron que la implementación del control por estructura con análisis de componentes principales fue significativamente más eficiente en tiempo computacional. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente estudio, ya que el modelo con las CPs aleatorias fue el único que no produjo QTL falsos. Existe información previa, con las mismas líneas de cebada usadas en este trabajo que indican la ausencia de QTL para rendimiento (Comadran *et al.*, 2009).

En contextos de bajo LD y escasa estructuración genética, la incorporación de las CPs como efecto fijo puede producir una sobre-parametrización del modelo que conduce a un incremento en la tasa de FP. En nuestro estudio, al igual que lo informado por Malosetti *et al.* (2007) y Gutiérrez *et al.* (2011), el modelo con CP de efecto fijo y el modelo sin corrección por estructura produjeron un gran número de falsos positivos o asociaciones espurias. Este resultado debería ser frecuente en situaciones donde la estructura poblacional es de poca magnitud y el número de componentes necesario para resumirla resulta alto. En tal contexto, el modelo lineal a estimar usa una cantidad alta de parámetros para describir poca variabilidad. Cappa *et al.* (2013) al estudiar el comportamiento de diversos modelos de mapeo, propuestos por Yu *et al.* (2006) en poblaciones de eucalipto en Argentina y Uruguay, concluyeron que para cuatro de los seis caracteres estudiados, el modelo con las CPs aleatorias fue el mejor. La incorporación de las CPs como covariables de efectos aleatorios para contemplar la estructura poblacional, disminuyó, en nuestro trabajo, la tasa de falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranzana M.J., Kim S., Zhao K., Bakker E., Horton M., Jakob K., Lister C., Molitor J., Shindo C., Tang C., Toomajian C., Traw B., Zheng H., Bergelson J., Dean C., Marjoram P., Nordborg M. (2005) Genome-wide association mapping in arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genetics* 1(5): e60.
- Balloux F. (2001) EASYPOP (Version 1.7): A computer program for population genetics simulations. *Journal of Heredity* 92 (3): 301-302.
- Balzarini M., Di Rienzo J. (2004) Info-Gen Córdoba: Universidad Nacional de Cordoba, Argentina.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57: 289-300.
- Bonamico N., Balzarini M., Arroyo A., Ibañez M., Díaz D., Salerno J., Di Renzo M. (2010) Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. *Phyton* 79: 8.
- Breseghele F., Sorrells M.E. (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172 (2): 1165-1177.
- Cappa E.P., El-Kassaby Y.A., Garcia M.N., Acuña C., Borralho N.M.G., Grattapaglia D., Marcucci Poltri S.N. (2013) Impacts of population structure and analytical models in genome-wide association studies of complex traits in forest trees: A case study in eucalyptus globulus. *PLoS ONE* 8 (11): e81267.
- Comadran J., Thomas W.T.B., Eeuwijk F.Á., Ceccarelli S., Grandó S., Stanca A.M., Pecchioni N., Akar T., Al-Yassin A., Benbelkacem A., Ouabbou H., Bort J., Romagosa I., Hackett C.A., Russell J.R. (2009) Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics* 119 (1): 175-187.
- Corder E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M., Schmechel K.E., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-vance M.A. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 7: 4.
- D'hoop B., Paulo M., Mank R., Eck H., Eeuwijk F. (2008) Association mapping of quality traits in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 161 (1-2): 47-60.

- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. Harlow, UK.
- Francia E., Rizza F., Cattivelli L., Stanca A.M., Galiba G., Tóth B., Hayes P.M., Skinner J.S., Pecchioni N. (2004) Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) × 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics* 108 (4): 670-680.
- Gutiérrez L. (2011) Mapeo Asociativo. Material en formato de documento portátil (pdf) del curso de posgrado de la Maestría en Ciencias Agrarias; utilización de herramientas genómicas en vegetales: análisis de QTL. UdelaR, Facultad de Agronomía. EEMAC Paysandú.
- Gutiérrez L., Cuesta-Marcos A., Castro A.J., von Zitzewitz J., Schmitt M., Hayes P.M. (2011) Association mapping of malting quality quantitative trait loci in winter barley: positive signals from small germplasm arrays. *Plant Genome* 4 (3): 256-272.
- Hottelling H. (1936) Relations between two sets of variables. *Biometrika* 28: 321-377.
- Kraakman A.T.W., Martínez F., Mussiraliev B., Eeuwijk F.A., Niks R.E. (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding* 17 (1): 41-58.
- Lynch M., Walsh B. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Massachusetts, USA.
- Malosetti M., van der Linden C., Vosman B., van Eeuwijk F. (2007) A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to phytophthora infestans in potato. *Genetics* 175 (2): 879-889.
- Melchinger A.E., Utz H.F., Schön C.C. (1998) Quantitative Trait Locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149 (1): 383-403.
- Muñoz-Amatriáin M., Cuesta-Marcos A., Endelman J.B., Comadran J., Bonman J.M., Bockelman H.E., Chao S., Russell J., Waugh R., Hayes P.M., Muehlbauer G.J. (2014) The USDA Barley core collection: genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies. *PLoS ONE* 9 (4): e94688.
- Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M., Weinblatt M.E., Shadick N.A., Reich D. (2006) Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics* 38 (8): 5.
- Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R Development Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- Remington D., Thornsberry J., Matsuoka Y., Wilson L., Whitt S., Doebley J., Kresovich S., Goodman M., Buckler E. (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceeding of National Academy of Science USA* 98 (20): 6.
- Searle S.R., Casella G., McCulloch C.E. (2008) Maximum likelihood (ML) and restricted maximum likelihood (REML), in *Variance Components*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 232-257.
- Stich B., Melchinger A., Heckenberger M., Möhring J., Schechert A., Piepho H.P. (2008) Association mapping in multiple segregating populations of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 117 (7): 1167-1179.
- Thornsberry J., Goodman M., Doebley J., Kresovich S., Nielsen D., Buckler E. (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* 28: 3.
- Tracy C.A., Widom H. (1994) Level-spacing distributions and the airy kernel. *Communications in Mathematical Physics* 159 (1): 23.

- von Zitzewitz J., Cuesta-Marcos A., Condon F., Castro A.J., Chao S., Corey A., Filichkin T., Fisk S.P., Gutierrez L., Haggard K., Karsai I., Muehlbauer G.J., Smith K.P., Veisz O., Hayes P.M. (2011) The genetics of winterhardiness in barley: Perspectives from genome-wide association mapping. *Plant Genome* 4 (1): 76-91.
- Wang M., Jiang N., Jia T., Leach L., Cockram J., Waugh R., Ramsay L., Thomas B., Luo Z. (2012) Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, pp.: 1-14.
- Yu J., Buckler E.S. (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17 (2): 155-160.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Vroh Bi I., Yamasaki M., Doebley J.F., McMullen M. D., Gaut B.S., Nielsen D.M., Holland J.B., Kresovich S., Buckler E.S. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38 (2): 203-208.
- Zhang Z., Ersoz E., Lai C.Q., Todhunter R.J., Tiwari H.K., Gore M.A., Bradbury P.J., Yu J., Arnett D.K., Ordovas J.M., Buckler E.S. (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics* 42 (4): 355-360.
- Zhu C., Gore M., Buckler E., Yu J. (2008) Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome* 1 (1): 16.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los revisores por sus valiosas sugerencias. El presente trabajo es parte del trabajo de tesis de Andrea Peña Malavera para el cumplimiento de los requisitos del Doctorado en Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Nacional de Córdoba y del Programa de becas de posgrado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

ANEXO

Nota: "yield" es la variable respuesta para nuestros análisis

```
#Carga de archivos
qtl.data<-load.data(P.file="QAssociation_pheno.txt",G.
file="QAssociation_geno.txt", map.file="QAssociation_
map.txt", cross="am", heterozygotes="FALSE")
#Estudio de la estructura de población
pca<-pca.analysis(file=qtl.data, p.val=0.05)
#Estudio de la caída de LD dentro de los cromosomas
LD.plots(file=qtl.data, structure="FALSE",
heterocigotes="TRUE")
#Asociaciones marcadores-caracteres utilizando diferentes
modelos.
#1. Con las CPs aleatorias
(pcaR.am<-am(file=qtl.data,method="mixed.
random",provide.K=FALSE,covariates= pca$scores,
trait="yield", threshold="FDR", p=0.05, out.file="AM
fixed PCAmodel"))$selected
#2. Con las CPs fijas
(pca.am<-am(file=qtl.data, method="fixed",
provide.K=FALSE, covariates=pca$scores,
trait="yield",threshold="FDR", p=0.05,out.file="AM
fixed PCAmodel"))$selected
#3. Modelo sin correction por estructura
(naive.am<-am(file=qtl.data, method="naive",
provide.K=FALSE, covariates=FALSE, trait="yield",
threshold=0.05, p=0.05, out.file="AM naive
model"))$selected
#Grafica los resultados para cada modelo, se presenta sólo
un caso
p.file<-pcaR.am$p.val
xyplot(-log10(p.file[,3])~p.file[,2] | factor(p.
file[,1]),type="h",layout=c(length(unique
(p.file[,1])),1),col="red",xlab="Posición de
Cromosoma",ylab="-log10(P)",main="Mapeo
Asociativo con CPs aleatorias",scales=list(x="free"),ylim
=c(0,(max(-log10(p.file[,3]))+0.5)))
```


ZINC SULFATE SUPPLEMENTATION OF CULTURED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES: GENOMIC INSTABILITY RELATED TO ITS DEFICIENCY AND EXCESS

SUPLEMENTACIÓN DE CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA CON SULFATO DE ZINC: INESTABILIDAD GENÓMICA ASOCIADA A SU DEFICIENCIA Y EXCESO

Padula G.^{1,2}, Ponzinibbio M.V.², Seoane A.I.¹

¹Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, La Plata, Argentina.

²Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando Noel Dulout (IGEVEV), FCV, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina.

giselpadula@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Zinc (Zn) plays a vital role in children growth and is involved in DNA synthesis and maintenance processes. The current nutrient intake recommendations do not consider the levels required for maintaining genomic stability. The objective of this study is to analyze the cytotoxic and genotoxic effect of *in vitro* Zn supplementation to evaluate deficiency and excess, and the concentrations within the normal physiological range established for children (80–280 µg/dl). To achieve Zn deficiency, the HAMF12 medium (HF12) was chelated (HF12Q). Lymphocytes were isolated from healthy donors and cultured for 7 days: 1-control (HF12, 60 µg/dl SO₄Zn); 2-deficient (HF12Q, 0 µg/dl SO₄Zn); 3-80 (HF12Q + 80 µg/dl SO₄Zn); 4-180 (HF12Q + 180 µg/dl SO₄Zn); 5-280 (HF12Q + 280 µg/dl SO₄Zn); 6-380 (HF12Q + 380 µg/dl SO₄Zn). Comet and micronucleus assays were performed, and cell viability was determined. Differences were evaluated with χ^2 and ANOVA ($p < 0.05$). The DNA damage index (comet assay) was significantly higher in the deficient culture respect to the others. Only the 380 µg/dl dose showed significantly increased frequency in DNA damage in relation to the other supplemented cultures. Micronuclei frequency was significantly higher in the deficient, 280 and 380 µg/dl cultures in comparison with the control, 80 and 180 µg/dl. The higher frequency of chromosomal damage was observed at 380 µg/dl SO₄Zn. *In vitro* Zn supplementation reduced genomic instability. Supplementation with Zn at 80 µg/dl and 180 µg/dl proved to be the most beneficial in reducing genomic instability, whereas doses of 280 and 380 µg/dl would cause an increase in DNA damage.

Key words: Zinc sulfate, Genomic stability, Recommended dietary allowances, Children

RESUMEN

El Zinc (Zn) juega un papel vital en el crecimiento de los niños y participa en la síntesis y mantenimiento del ADN. Las actuales recomendaciones de ingesta de nutrientes no tienen en cuenta los niveles requeridos para el mantenimiento de la estabilidad genómica. El objetivo del trabajo es analizar el efecto citotóxico y genotóxico de la suplementación *in vitro* con Zn para evaluar la deficiencia y el exceso, así como las concentraciones dentro del rango fisiológico normal establecido para niños (80–280 µg/dl). Para lograr la deficiencia de Zn, el medio HAMF12 (HF12) fue quelado (HF12Q). Los linfocitos fueron aislados de donantes sanos y cultivados durante 7 días: 1-control (HF12, 60 µg/dl SO₄Zn); 2-deficiente (HF12Q, 0 µg/dl SO₄Zn); 3-80 (HF12Q + 80 µg/dl SO₄Zn); 4-180 (HF12Q + 180 µg/dl SO₄Zn); 5-280 (HF12Q + 280 µg/dl SO₄Zn); 6-380 (HF12Q + 380 µg/dl SO₄Zn). Se utilizaron los ensayos de micronúcleo y cometa y se determinó la viabilidad celular. Las diferencias fueron evaluadas con χ^2 y ANOVA ($p < 0,05$). El índice de daño, resultó significativamente más alto en el cultivo deficiente respecto de los demás. Sólo la dosis 380 µg/dl presentó frecuencias significativamente aumentadas en relación a los otros cultivos suplementados. La frecuencia de micronúcleos (MNI) fue significativamente mayor en los cultivos deficientes, 280 y 380 µg/dl, respecto del control, 80 y 180 µg/dl. La mayor frecuencia se observó en 380 µg/dl. La suplementación de los cultivos *in vitro* con zinc ayudaría a reducir la inestabilidad genómica. Las dosis más beneficiosas serían las de 80 y 180 µg/dl, en tanto que las de 280 y 380 µg/dl provocarían un aumento de daño en el ADN.

Palabras clave: Sulfato de zinc, Estabilidad genómica, Ingesta recomendada de nutrientes, Niños

Fecha de recepción: 08/08/2014

Fecha de aceptación de versión final: 24/09/2014

INTRODUCCIÓN

La transición nutricional de nuestro país se caracteriza por la disminución de la malnutrición aguda, un aumento de la obesidad y cifras relativamente altas de retraso crónico del crecimiento y desnutrición oculta (Carmuega, 1996; O'Donnell y Carmuega, 1999). La OMS y UNICEF han definido como desnutrición oculta a un conjunto de carencias específicas de micronutrientes que se caracterizan por ser altamente prevalentes, de importancia en la salud infantil y que requieren de cierta instrumentación para su diagnóstico. Entre los micronutrientes más importantes para el crecimiento infantil se encuentran el zinc, el hierro, la vitamina A, algunas vitaminas del grupo B como la riboflavina, el ácido fólico, la niacina y los ácidos grasos esenciales.

No existe un criterio o indicador que por sí solo permita objetivar la calidad de la dieta. Sin embargo, cuando se considera sólo la composición de nutrientes, la densidad nutricional es un indicador más apropiado que la composición centesimal. Es decir, la proporción de cada nutriente relativo a la cantidad de energía que contiene un alimento o el conjunto de la dieta. Para esto, se utiliza como patrón de referencia las recomendaciones diarias de ingesta de nutrientes (RDAs) del National Research Council (1989), expresadas en forma absoluta como la cantidad de nutrientes recomendada por día.

Las actuales RDAs de vitaminas y minerales están basadas en la prevención de enfermedades tales como el escorbuto en el caso de la vitamina C, anemia en el caso del ácido fólico y la pelagra para la niacina. Sin embargo, los micronutrientes son importantes en la prevención de enfermedades degenerativas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y envejecimiento prematuro, debido al rol que desempeñan en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Ambrosse *et al.*, 1999; Giovannucci, 1998; Morris, 1998; Zhang, 1998; Watkins, 2000). Es ampliamente reconocido, que la exposición *in vivo* a agentes mutagénicos y carcinogénicos puede incrementar la mutación genética y las aberraciones cromosómicas en las poblaciones humanas (Parry, 1988). Más tardíamente se reconoce que una dieta desbalanceada puede tener efectos similares (Ames, 1998). La dieta puede ser un factor clave en la estabilidad genómica dado su impacto sobre mecanismos relevantes tales como: exposición a carcinógenos dietarios, activación/detoxicación de carcinógenos, síntesis y reparación

del ADN y apoptosis. Muchos minerales y vitaminas actúan como sustrato y/o cofactores en reacciones de mantenimiento del ADN, por lo que su concentración exacta en la célula es crítica. Así, niveles no óptimos de estos micronutrientes podrían imposibilitar la actividad de enzimas requeridas para la estabilidad genómica, al provocar fracturas de doble o simple cadena sobre el ADN, lesiones oxidativas o ambas (Fenech, 2001; 2005). Debido a lo anteriormente expuesto, existe una fuerte conciencia internacional sobre la necesidad de redefinir los requerimientos óptimos de minerales y vitaminas para prevenir el daño sobre el ADN.

La deficiencia severa de zinc (Zn) es rara, pero las deficiencias medias son relativamente frecuentes, especialmente en etapas tempranas del ciclo de vida como la infancia y la niñez (Hambidge, 1989). Dicha deficiencia provocaría una disminución en el crecimiento y el desarrollo de los niños (Walsh, 1994; Ruz *et al.*, 1997), afectando principalmente la talla, por lo que habría una alta prevalencia de deficiencia de Zn en aquellas poblaciones con retardo crónico del crecimiento (Flores *et al.*, 1985; Rosado, 1998; CESNI, 2001; González *et al.*, 2006; Grandy *et al.*, 2010), como la nuestra. La deficiencia de este micronutriente también afecta al sistema inmunológico, debido a que altera la división y multiplicación celular requeridas para la defensa del huésped ante un patógeno; suprime parcialmente la función del timo y disminuye la proliferación y función de los linfocitos T y B (Walsh, 1994; Solomons, 1998). También se ha notificado la inducción de alteraciones en el crecimiento y desarrollo del cerebro provocando trastornos cognitivos (Walsh, 1994; Beard, 1996). El Zn se transporta en plasma unido a la albúmina y, en menor medida, a las alfa₂ macroglobulinas, por lo que su concentración plasmática varía en la infección, el estrés y el ejercicio físico intenso (CESNI, 2001). La explicación a todos estos efectos asociados a la deficiencia de Zn, sería el rol que éste desempeña en la síntesis del ADN y la proliferación celular.

El Zn es un componente esencial de aproximadamente 300 proteínas, entre ellas la superóxidodismutasa Cu/Zn, endonucleasa IV, p53 y proteínas “dedos” de Zn (como la PARP). Está involucrado en el proceso de estabilidad genómica y expresión génica en una variedad de modos, incluyendo la estructura de la cromatina, la replicación del ADN y la transcripción del ARN, a través de factores de transcripción y de las ARN y ADN polimerasas (Urrutia, 1997; Lin *et al.*, 1998; Rosado, 1998). Asimismo, desempeña

un rol importante en la reparación del ADN (Dreosti, 2001) y en la muerte celular programada o apoptosis (Richard *et al.*, 1993; McGowan *et al.*, 1994; Sunderman, 1995; Record *et al.*, 1996; Parat *et al.*, 1997; Falchuk, 1998; Favier, 1998; Leccia *et al.*, 1999; Chimienti *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2005; Clegg *et al.*, 2005; Bae *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2006). En la actualidad el conocimiento sobre los niveles óptimos para la estabilidad genómica es escaso y desordenado, sin embargo, existe suficiente evidencia que sugiere que la deficiencia marginal de Zn impacta significativamente en el porcentaje de daño cromosómico espontáneo (Fenech y Ferguson, 2001; Fenech, 2001; 2002; Sharif *et al.*, 2011; 2012). Por otra parte, en trabajos realizados *in vitro*, se observó que el exceso de diversas sales de Zn, tales como cromato, citrato y sulfato, provocaría un efecto citotóxico y genotóxico en diferentes líneas celulares (Bae *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2010; Sharif *et al.*, 2011) y animales de laboratorio (Tapisso *et al.*, 2009).

Debido a que el Zn juega un papel vital en el crecimiento de los niños y participa en los procesos de síntesis y mantenimiento del ADN, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto citotóxico y el daño cromosómico y citomolecular provocado tanto por la deficiencia como por el exceso de Zn. Asimismo, se realizará la valoración citotóxica y de daño genético inducido por las dosis de Zn dentro del rango fisiológico normal de Zn establecido actualmente para niños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de linfocitos de sangre periférica y diseño experimental

Se ha demostrado que el modelo *in vitro* de cultivo de linfocitos de sangre periférica, es muy eficaz para determinar el efecto de los micronutrientes sobre la citotoxicidad y el daño genómico (Kimura *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009; Fenech, 2010). Este modelo es esencial para definir la concentración óptima y el límite superior más seguro de los micronutrientes (Fenech, 2010). En este sentido, se trabajó con linfocitos aislados de sangre periférica obtenida de seis donantes sanos de sexo femenino, de edades comprendidas entre 5 y 10 años. Las muestras fueron obtenidas con expresa autorización del mayor responsable (Ley Provincial N° 11.044). Los linfocitos fueron cultivados en frascos T25, utilizando como medio base 10 ml de HAM F12 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), sin suero fetal bo-

vino, con la adición de antibióticos (60 UI de Penicilina y 50 µg/ml de Estreptomina) (Bagó Laboratories, Buenos Aires, Argentina) y 100 µg/ml de fitohemaglutinina (Gibco-Invitrogen).

Para lograr la deficiencia de Zn, el medio HAMF12 (HF12) fue quelado (HF12 Q). Se utilizó Chelex-100 (95577 Sigma) al 10%, según procedimiento descrito por Sharif *et al.* (2011; 2012), con algunas modificaciones.

Se tomaron tres dosis de sulfato de Zn (SO₄Zn) dentro del rango fisiológico normal determinado para niños (80–280 µg/dl) (Feliu *et al.*, 2005) y dos dosis por fuera, para evaluar el efecto de la deficiencia y el exceso. De esta manera se establecieron 6 cultivos: 1- control negativo (HF12 Q, 60 µg/dl SO₄Zn); 2- deficiente en Zn (HF12 Q, 0 µg/dl SO₄Zn); 3- límite inferior (HF12 Q + 80 µg/dl SO₄Zn); 4- límite medio (HF12 Q + 180 µg/dl SO₄Zn); 5- límite superior (HF12 Q + 280 µg/dl SO₄Zn); 6- exceso de Zn (HF12 Q + 380 µg/dl SO₄Zn).

Para llevar a cabo la estimación de viabilidad celular mediante tinción con el colorante vital azul de tripano, el ensayo de electroforesis en gel de célula única (cometa) y el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN), las muestras fueron cultivadas a 37° C en 5% de CO₂, durante 7 días (Fenech, 2010; 2014), en las condiciones mencionadas. Al día 7, 100 µl de la suspensión celular se transfirieron a tubos cónicos (Eppendorf) para evaluar la viabilidad celular, 100 µl se utilizaron para el ensayo cometa, y el resto de las células se destinaron para el ensayo CBMN.

Cada cultivo se realizó por duplicado y el experimento se repitió 3 veces para permitir una estimación precisa de la variación experimental.

Espectrofotometría de Absorción Atómica

Se determinó la concentración de Zn al inicio y al finalizar los cultivos, a través de espectrofotometría de Absorción Atómica, previa dilución con ácido tricloroacético (Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP).

Estimación de necrosis celular mediante tinción con el colorante vital azul de tripano

Se contó el número de células inmediatamente después de los tratamientos. Para ello, las mismas fueron teñidas con el colorante vital azul de tripano y luego cuantificadas en cámara de Neubauer.

Ensayo de electroforesis de un sola célula (ensayo cometa versión alcalina)

El ensayo cometa permite cuantificar los fenómenos de daño en el ADN a nivel individual. La migración del ADN toma el aspecto de un cometa y, de allí, el nombre que se le ha dado a esta técnica. El ensayo se realizó en condiciones alcalinas, de acuerdo al método de Singh *et al.* (1988). Las células se embeben en agarosa de bajo punto de fusión (0,5%) y se depositan en portaobjetos previamente cubiertos con agarosa 150 mL, agarosa 0,5% de punto de fusión normal. Posteriormente, los portaobjetos se sumergen en solución de lisis pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100) durante 24 hs. A continuación se procede a un tratamiento alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) por 20 minutos antes de la electroforesis. Esta se realiza a 4° C, 20 V y 250 mA durante 20 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se lavan con una solución de neutralización y las células se colorean con una solución 1/1000 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Se analizan 200 imágenes por punto experimental utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40, equipado con filtros de excitación de 515–560 nm). La asignación de niveles o grados de daño se realiza según la extensión que adquiere la cola del cometa. Las células son clasificadas en 5 categorías, desde 0 (cola no visible) hasta 4 (cabeza de cometa detectable y más ADN en la cola) (Olive, 1999; Collins, 2004). A partir de esta clasificación se obtiene el índice de daño (ID) (Collins, 2004).

Ensayo de Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Si bien existen muchos métodos para evaluar la estabilidad genómica, a la fecha, el CBMN sería el más indicado para valorar el efecto provocado por una ingesta inadecuada de micronutrientes (Fenech, 2010). La simplicidad del conteo y la aplicabilidad del ensayo de micronúcleos *in vitro* en diferentes tipos celulares, lo convierten en una herramienta atractiva para la evaluación de anomalías cromosómicas (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). La Citocalasina B, producida por el hongo *Helminthosporium dematioides*, en bajas concentraciones bloquea la citocinesis y la movilidad celular dando como resultado células binucleadas (BN). El micronúcleo (MNi) se origina de un fragmento cromosómico o de un cromosoma entero que queda retrasado en anafase durante la división celular (Fenech, 2010). Asimismo, los puentes nucleoplásmicos (NPBs) entre los núcleos de una célula BN, proveen una medida de los rearrreglos cromosómicos

(Umegaki y Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003), ya que son el producto de cromosomas dicéntricos. En la década pasada, emergió otro mecanismo de formación de MNi conocido como brote nuclear (BUDs). Shimizu *et al.* (1998; 2000) demostraron que la amplificación del ADN se localiza en sitios específicos de la periferia del núcleo y se elimina a través de brotes nucleares que forman los MNi durante la fase S del ciclo celular. Debe demostrarse que la proliferación celular es suficiente para asegurar que la mayoría de las células contadas deriva de la primera o de la primera y segunda división luego del tratamiento (Fenech, 2007). Para ello se utiliza el índice de división nuclear (NDI): $1 \times n^\circ$ de células mononucleadas + $2 \times n^\circ$ de células binucleadas + $3 \times n^\circ$ de células tri y tetranucleadas / n° total de células contadas (500 células). Aproximadamente 24 hs antes de la finalización del cultivo, las células se tratan con citocalasina B (3 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA). La suspensión celular se centrifuga y el botón celular (*pellet*) se resuspende con 5 ml de fijador (metanol:ácido acético 3:1). Se realizan tres lavados con fijador, se resuspende y se gotean en portaobjetos limpios. Se tiñen con Giemsa 5% durante 10 minutos. Se analizan 1.000 células por punto experimental de acuerdo a los criterios de Fenech (2007).

Estadística

Los resultados del ensayo cometa y el análisis de micronúcleos fueron estadísticamente analizados por medio de la Prueba de χ^2 , mientras que la viabilidad celular fue evaluada a través de la Prueba de ANOVA con el programa Statgraphics® 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD), considerando un $p < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm errores estándar.

RESULTADOS

La quelación del Zn del medio de cultivo analizado mediante espectrofotometría de absorción atómica fue total, mientras que otros metales divalentes (cobre y hierro) no fueron afectados (datos no mostrados).

Se estimó la viabilidad celular mediante tinción con el colorante vital azul de tripano, los resultados se resumen en la Tabla 1. El análisis de la varianza evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$). Por medio del análisis de componentes principales se observó que dichas diferencias fueron estadísticamente significativas para todas las comparaciones excepto

Tabla 1. Estimación de la viabilidad celular mediante tinción con el colorante vital azul de tripano. Entre paréntesis se indica el error estándar.

Cultivos	Millones células/ml
Control	4,80 (0,09)
Deficiente	2,20 (0,06)
80 µg/dl SO ₄ Zn	4,42 (0,04)
180 µg/dl SO ₄ Zn	6,60 (0,13)
280 µg/dl SO ₄ Zn	1,00 (0,02)
380 µg/dl SO ₄ Zn	0,45 (0,001)

Prueba de ANOVA
F = 200,44; p < 0,001

para control y 80 µg/dl SO₄Zn. La frecuencia de células necróticas fue significativamente superior en el cultivo deficiente, así como en los suplementados con 280 y 380 µg/dl SO₄Zn, respecto de los cultivos control, 80 y 180 µg/dl SO₄Zn. Es de resaltar que los cultivos suplementados con 380 µg/dl SO₄Zn presentaron frecuencias significativamente superiores a las observadas en los cultivos deficiente y 280 µg/dl SO₄Zn. Por su parte, los cultivos suplementados con 180 µg/dl SO₄Zn fueron los que mostraron el mayor porcentaje de células viables.

Se determinaron las fracturas de cadena del ADN así como los sitios lábiles al álcali a través del ensayo cometa (Tabla 2). El cultivo deficiente en Zn, presentó un incremento estadísticamente significativo del ID respecto a todos los demás cultivos (p < 0,001). Los cultivos suplementados mostraron una reducción de este índice. Sin embargo,

las dosis más altas mostraron frecuencias de daño aumentadas en relación a los cultivos control, 80 µg/dl SO₄Zn y 180 µg/dl SO₄Zn (valores de p se muestran en Tabla 2). Las dosis de 80 µg/dl SO₄Zn y 180 µg/dl son las que presentan el menor ID.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos con el ensayo CBMN. El efecto citotóxico fue evaluado a través del índice de división nuclear. Se observa una disminución del mismo tanto en los cultivos deficientes de Zn como en los suplementados con 280 y 380 µg/dl SO₄Zn. El NDI más elevado se observa en los cultivos de 80 y 180 µg/dl. Ninguna de estas diferencias resultó significativa desde el punto de vista estadístico. Para valorar el daño cromosómico, se contabilizó la frecuencia de MNi, NPBs y NBuds en 1.000 células BN. La frecuencia de MNi fue significativamente superior desde el punto de vista estadístico en el cultivo deficiente, así como en los suplementados con 280 y 380 µg/dl SO₄Zn, respecto de los cultivos control, 80 y 180 µg/dl SO₄Zn, los cuales presentaron frecuencias similares (valores de p se muestran en la Tabla 3). Cabe destacar, que los cultivos suplementados con 380 µg/dl SO₄Zn presentaron frecuencias de MNi superiores a las observadas en los cultivos deficientes. Por su parte, los cultivos suplementados con 80 y 180 µg/dl de SO₄Zn fueron los que mostraron el menor daño cromosómico. Los resultados obtenidos para NPBs y NBuds fueron dispares, mostrando valores superiores para los cultivos suplementados con 80 y 280 µg/dl SO₄Zn, respecto del resto de los cultivos. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 2. Determinación de los grados de daño (Go-G4) en el ADN y estimación del índice de daño (ID), a través del ensayo cometa. Entre paréntesis se indica el error estándar.

Cultivos	Go	G1	G2	G3	G4	ID
Control	0,94 (0,10)	0,06 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,50
Deficiente ¹	0,67 (0,08)	0,22 (0,05)	0,09 (0,03)	0,03 (0,02)	0,00 (0,00)	48,00
80 µg/dl SO ₄ Zn	0,97 (0,10)	0,03 (0,02)	0,01 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,25
180 µg/dl SO ₄ Zn	0,94 (0,10)	0,04 (0,02)	0,02 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,70
280 µg/dl SO ₄ Zn ²	0,95 (0,10)	0,05 (0,02)	0,01 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	13,00
380 µg/dl SO ₄ Zn ³	1,19 (0,11)	0,11 (0,03)	0,04 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	18,30

Prueba de χ^2

¹ Deficiente vs. Control (p < 0,001); Deficiente vs. 80 µg/dl (p < 0,001); Deficiente vs. 180 µg/dl (p < 0,001); Deficiente vs. 280 µg/dl (p < 0,001); Deficiente vs. 380 µg/dl (p < 0,001).

² 280 µg/dl vs. 80 µg/dl (p < 0,05).

³ 380 µg/dl vs. Control (p < 0,05); 380 µg/dl vs. 80 µg/dl (p < 0,01); 380 µg/dl vs. 180 µg/dl (p < 0,05).

Tabla 3. Frecuencias de micronúcleos (MNi), puentes nucleoplásmicos (NPBs), brotes nucleares (BUDs) e índice de división nuclear (NDI), obtenidas con el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN). Entre paréntesis se indica el error estándar.

Cultivos	MNi ‰	NPBs ‰	BUDs ‰	NDI
Control	1,00 (0,30)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,76 (0,13)
Deficiente ¹	2,10 (0,41)	2,30 (0,15)	0,00 (0,00)	1,68 (0,13)
80 µg/dl SO ₄ Zn	1,30 (0,34)	6,50 (0,25)	1,00 (0,10)	1,78 (0,13)
180 µg/dl SO ₄ Zn	0,90 (0,29)	1,00 (0,10)	1,00 (0,10)	1,82 (0,13)
280 µg/dl SO ₄ Zn ²	2,10 (0,41)	10,0 (0,30)	2,00 (0,14)	1,64 (0,13)
380 µg/dl SO ₄ Zn ³	3,20 (0,47)	1,00 (0,10)	0,00 (0,00)	1,52 (0,12)

Prueba de χ^2

¹ Deficiente vs. Control ($p < 0,05$); Deficiente vs. 180 µg/dl ($p < 0,05$);

² 280 vs. Control ($p < 0,05$); 280 vs. 180 µg/dl ($p < 0,05$);

³ 380 vs. Control ($p < 0,001$); 380 vs. 80 µg/dl ($p < 0,01$); 380 vs. 180 µg/dl ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se utilizó el sulfato de Zn para suplementar los cultivos, debido a que en otros estudios se constató que esta sal presentaba mayor biodisponibilidad que otras (Sharif *et al.*, 2011; 2012). El estado nutricional del Zn no depende sólo de la cantidad ingerida, sino también de su biodisponibilidad y del consumo en la dieta de inhibidores de la absorción de este nutriente, tales como los fitatos, las fibras, el hierro y el calcio, entre otros (Sandstead, 2000; CESNI, 2001; Pizarro y Calvo, 2009).

Los alimentos de origen animal, particularmente las carnes, los mariscos y el pescado, son fuentes ricas en Zn y su biodisponibilidad es alta, ya que durante su digestión se liberan ciertos aminoácidos y péptidos que contienen lisina y que forman complejos solubles con el Zn (Rosado, 1998). Sin embargo, por razones culturales y por su alto costo, la carne es consumida en bajas cantidades por las poblaciones de riesgo. Más aún, estas poblaciones, habitualmente, consumen dietas basadas en cereales y legumbres, las cuales contienen cantidades significativas de fitatos. A su vez, se ha registrado en la población infantil una incorporación tardía de los alimentos de origen animal durante la etapa de complementación, exponiendo así a los niños pequeños a la deficiencia de Zn y comprometiendo de manera irreversible su potencial de crecimiento. En Argentina, desde el punto de vista epidemiológico, el patrón de

consumo alimentario sufrió modificaciones en los últimos treinta años en todos los estratos sociales, observándose una disminución del consumo de carnes, frutas y verduras (Aguirre, 2005).

Para analizar el efecto de la deficiencia y el exceso de Zn, se utilizaron el ensayo cometa y el ensayo CBMN, los cuales se complementan y brindan una amplia información acerca de la posible inducción de daño al material genético provocado por una inadecuada ingesta de nutrientes. El ensayo cometa alcalino, provee una medida de la inducción de fracturas de simple y doble cadena del ADN que permanecen sin reparar. Por otra parte, los MNi y los NPBs ocurren debido a una falla en la reparación de las fracturas de cadena del ADN que ocasionan la producción de fragmentos acéntricos y cromosomas dicéntricos. Los resultados de este estudio muestran que la deficiencia de Zn genera un incremento de las fracturas de cadena del ADN. En otros trabajos también se observaron frecuencias elevadas de daño en el ADN, medidas a través del ensayo cometa (Ho y Ames, 2002; Yan *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009a; 2009b; 2009c). La elevada frecuencia de daño en el ADN observada en este estudio producto de la deficiencia de Zn, puede ser el resultado del incremento en la oxidación del ADN. Existe numerosa evidencia, proveniente de trabajos experimentales *in vitro*, que indicaría que la adición de Zn protege a los grupos sulfhidrilos contra el daño

oxidativo (Bagchi, 1997; Bray y Bettger, 1990; Sunderman, 1995; Szuster *et al.*, 2000). En otros estudios también realizados *in vitro*, se observó que las células deficientes en Zn presentaban fallas en los mecanismos de reparación del ADN, con elevados niveles de daño (Dreosti, 2001; Ho y Ames, 2002; Yan *et al.*, 2008; Sharif *et al.*, 2012). En el presente trabajo la suplementación con concentraciones dentro del rango fisiológico normal (80–280 µg/dl) redujo las fracturas en el ADN en relación al cultivo deficiente en Zn, mientras que concentraciones elevadas (380 µg/dl) habrían ocasionado un aumento del daño, sugiriendo un potencial efecto genotóxico para el sulfato de Zn cuando se encuentra en exceso.

Los resultados obtenidos con el ensayo CBMN muestran que tanto la deficiencia como el exceso provocan un incremento en la frecuencia de MNi, más marcado aún en el exceso. Es de resaltar que el nivel superior del rango fisiológico normal establecido para niños (280 µg/dl) provocó la misma magnitud de daño cromosómico que la deficiencia. En trabajos previos (Sharif *et al.*, 2011) se observó un aumento de MNi y NPBs en la deficiencia (0 µM) y el exceso (32 µM), mientras que todas las concentraciones evaluadas dentro del rango fisiológico normal (4–16 µM) provocaron una disminución del daño.

En este estudio, el mayor porcentaje de células necróticas se observa en los cultivos que presentaban exceso de Zn, en los cuales el daño cromosómico también fue el más elevado. En un estudio reciente, se sugirió que la suplementación en exceso con este micronutriente, redujo la viabilidad de las células de rata INS-1E debido al aumento de la necrosis (Nygaard *et al.*, 2014). En otros trabajos *in vitro*, se observó que el exceso de otras sales de Zn, tales como cromato y citrato, también provocó un efecto citotóxico y genotóxico en diferentes líneas celulares (Bae *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2010; Sharif *et al.*, 2011) y animales de laboratorio (Tapisso *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, los cultivos deficientes presentaron una disminución de la viabilidad aunque no de modo tan marcado como en el exceso. En este sentido, en otros estudios se observó que la deficiencia de Zn indujo apoptosis en diversos tipos celulares, tales como fibroblastos, hepatocitos, precursores de células T, células del glioma y testiculares (Ho y Ames, 2002; Ho *et al.*, 2003; Bao y Knoell, 2006; Yan *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2009).

Los resultados del presente trabajo sugieren que la suplementación de los cultivos *in vitro* con Zn ayudaría a reducir la inestabilidad genómica. Las dosis más beneficiosas

serían las de 80 y 180 µg/dl. Por su parte, tanto los cultivos deficientes (0 µg/dl) como aquellos con las concentraciones más elevadas de Zn (280 y 380 µg/dl) inducirían una menor viabilidad y provocarían un mayor nivel de daño en el ADN y en los cromosomas. Asimismo, observamos que el nivel superior del rango fisiológico normal establecido para niños provocaría un incremento del efecto citotóxico resultando en una reducción de la viabilidad celular y, por otra parte, un aumento del daño cromosómico. En otros estudios, se observó que la suplementación con Zn dentro del rango fisiológico normal tuvo un efecto beneficioso sobre la estabilidad genómica en células WIL2-NS y queratinocitos de mucosa humana, mientras que el límite superior del rango farmacológico (100 µM) afectó de manera adversa algunos parámetros celulares (Sharif *et al.*, 2011; 2012). En contraste, en otro trabajo donde se evaluó el efecto de la suplementación con 100 µM de sulfato de Zn no se observó que la viabilidad de linfocitos humanos estuviera afectada (Sliwinski *et al.*, 2009).

En trabajos *in vivo* también se observó una relación entre el estado de Zn y el daño en el ADN (Bae *et al.*, 2007; Sliwinski *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2010; Sharif *et al.*, 2011). En un estudio realizado en hombres de entre 19 y 50 años (Song *et al.*, 2009c), donde se restringió la ingesta de este micronutriente y luego se la restableció, se registró un aumento significativo de fracturas del ADN durante el período de depleción. Este incremento se revirtió luego de la repleción de Zn, sugiriendo que el daño está relacionado con el nivel de Zn.

Se requerirán nuevos estudios para determinar la adecuada ingesta diaria de este micronutriente. Ya que, en primera instancia, es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* dosis-respuesta que permitan evaluar el efecto de la concentración del micronutriente sobre el daño genético y la citotoxicidad. Y, posteriormente, deben desarrollarse investigaciones *in vivo* de corte transversal, que sean útiles para valorar la asociación entre la ingesta de nutrientes y los marcadores utilizados para cuantificar el daño genético. Asimismo, futuras investigaciones en este tema, deberían poner énfasis en la elucidación de los mecanismos subyacentes por los cuales el Zn modularía la reparación del ADN, estudiando el daño oxidativo, los procesos epigenéticos de regulación de la reparación del ADN y los cambios en la expresión génica.

Las recomendaciones diarias de alimentos intentan dar una guía para la ingesta adecuada de nutrientes en la prevención de enfermedades causadas por la deficiencia

o el exceso. Es claro que determinar estos extremos es importante, pero el mayor reto en la prevención de enfermedades del desarrollo y degenerativas, es definir la ingesta apropiada de micronutrientes, individuales o combinados (nutriomas) para optimizar el funcionamiento celular y del organismo. Esta optimización depende de la prevención del daño en el genoma nuclear y mitocondrial. Así, “poner a punto” el metabolismo humano podría ser el mejor camino para minimizar el daño en el ADN, mejorando la salud y prolongando la esperanza de vida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al soporte financiero del CONICET (P.I.P. N° 0187).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre P. (2005) Características de las canastas de consumo de diferentes sectores de ingresos. En: Aguirre P. (Ed.) Estrategias de consumo: qué comen los argentinos que comen. Buenos Aires, Ed. Miño y Dávila, pp. 69-106.
- Ambrose C.B., Freudenheim J.L., Thompson P.A., Bowman E., Vena J.E., Marshall J.R., Laughlin R., Nemoto T., Shields P.G., Graham S. (1999) Manganese superoxide dismutase genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. *Cancer Res.* 59 (3): 602-606.
- Ames B.N. (1998) Micronutrients prevent cancer and delay ageing. *Toxicol. Lett.* 102/103: 5-18.
- Bae S.N., Kim J., Lee Y.S., Kim J.D., Kim M.Y., Park L.O. (2007) Cytotoxic effect of zinc citrate compound on choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 28: 22-30.
- Bae S.N., Lee Y.S., Kim M.Y., Kim J.D., Park L.O. (2006) Antiproliferative and apoptotic effects of zinc-citrate compound (CIZAR(R)) on human epithelial ovarian cancer cell line, OVCAR-3. *Gynecol. Oncol.* 103: 127-136.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J. (1997) Comparative In Vitro Oxygen Radical Scavenging Ability of Zinc Methionine and Selected Zinc Salts and Antioxidants. *Gen. Pharmac.* 28 (1): 85-91.
- Bao S., Knoell D.L. (2006) Zinc modulates airway epithelium susceptibility to death receptor-mediated apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290: L433-441.
- Beard J. (1996) Nutrient status and central nervous system function. In: Ziegler E.E., Filer Jr. L.J. (Eds.) *Present Knowledge in Nutrition*, ILSI Press, Washington, DC, pp. 612-622.
- Bray T.M., Bettger W.J. (1990) The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 281-291.
- Carmuega E. (1996) Transición epidemiológica y nutricional de la Argentina. Documento país presentado en el taller subregional OPS/OMS transición nutricional en la región de las Américas. Quito, Ecuador.
- CESNI (Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil), Boletín (2001) El zinc y el cobre en nutrición infantil.
- Chang K.L., Hung T.C., Hsieh B.S., Chen Y.H., Chen T.F, Cheng H.L. (2006) Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr.* 22: 465-474.
- Chimienti F., Jourdan E., Favier A., Seve M. (2001) Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1179-1190.
- Chung M.J., Walker P.A., Brown R.W., Hogstrand C. (2005) ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205: 225-236.
- Clegg M.S., Hanna L.A., Niles B.J., Momma T.Y., Keen C.L. (2005) Zinc deficiency induced cell death. *IUBMB Life* 57: 661-669.
- Collins A. (2004) The comet assay for DNA damage repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26 (3): 249-261.
- Dreosti I.E. (2001) Zinc and the gene. *Mutat. Res.* 475: 161-167.

- Falchuk K. (1998) The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol. Cell. Biochem.* 188: 41-48.
- Favier A. (1998) Is zinc a cellular mediator in the regulation of apoptosis. In: Bratter P., de Bratter V.N., Khasanova L., Etienne J.C. (Eds.) *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Paris, 5: 164-167.
- Feliu S.M., Piñeiro A., López C., Slobodianik N.H. (2005) Valores de referencia de cobre, zinc y selenio en niños. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39: 459-462.
- Fenech M. (2001) Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutat. Res.* 480-481: 51-54.
- Fenech M., Ferguson L.R. (2001) Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat. Res.* 475: 1-6.
- Fenech M. (2002) Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food Chem. Toxicol.* 40 (8): 1113-1117.
- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003) Human project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534: 65-75.
- Fenech M. (2005) The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis* 20 (4): 255-269.
- Fenech M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 5: 1084-1104.
- Fenech M. (2010) Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 1438S.
- Fenech M. (2014) Nutriomes and Personalised Nutrition for DNA Damage Prevention, Telomere Integrity Maintenance and Cancer Growth Control. *Cancer Treat. Res.* 159: 427-441.
- Flores M.E., Ramírez J.A., Vargas E., Calivá J.B., de Céspedes C. (1985) El zinc plasmático y su relación con los percentiles de crecimiento de niños costarricenses en áreas urbanas. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 6 (1): 38-50.
- Giovannucci G., Stampfer M.J., Colditz G.A., Hunter D.J., Fuchs C., Rosner B.A., Speizer F.E., Willett W.C. (1998) Multivitamin use, folate and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann. Int. Med.* 129: 517-524.
- González H., Disalvo L., Varea A. (2006) Repercusión de las deficiencias de micronutrientes en salud pública. *Ludovica Pediátrica* VII, 1: 10-15.
- Grandy G., Weisstaub G., López de Romaña D. (2010) Deficiencia de hierro y zinc en niños. *Rev. Soc. Bol. Ped.* 49 (1): 25-31.
- Hambidge K.M. (1989) Mild zinc deficiency in human subjects. In: Mills C.F. (Ed.) *Zinc in Human Biology*, Springer, London, pp. 281-296.
- Ho E., Ames B.N. (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53 NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16770-16775.
- Ho E., Courtemanche C., Ames B.N. (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J. Nutr.* 133: 2543-2548.
- Kimura M., Umegaki K., Higuchi M., Thomas P., Fenech M. (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J. Nutr.* 134: 48-56.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J.,

- Vanhouwaert A., Wakata A. (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540: 153-163.
- Leccia M.T., Richard M.J., Favier A. (1999) Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in culture human fibroblast. *Biol. Trace Elem. Res.* 69 (3): 177-90.
- Lin Y.L., Shivji M.K., Chen C. (1998) The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 273: 1453-1461.
- McGowan A., Fernandes R., Verhaegen S., Cotter T. (1994) Zinc inhibits UV radiation-induced apoptosis but fails to prevent subsequent cell death. *Int. J. Radiat. Biol.* 66: 343-349.
- Morris M.C., Beckett L.A., Scherr P.A., Herbert L.E., Bennett D.A., Field T.S., Evans D.A. (1998) Vitamin E and Vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12 (3): 121-126.
- National Research Council (1989) Food and Nutrition Board: Recommended daily dietary allowances, ed 10^a. National Academy of Sciences, National Research Council, Washington DC.
- Nygaard S.B., Larsen A., Knuhtsen A., Rungby J., Smidt K. (2014) Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro -cell function in INS-1E cells. *BMC Research Notes* 7: 84.
- O'Donnell A., Carmuega E. (1999) Hoy y Mañana. Salud y calidad de vida de la Niñez Argentina. Documentos y discusiones del taller realizado en Villa La Angostura. Buenos Aires: CESNI.
- Olive P. (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 75: 395.
- Parat M.O., Richard M.J., Pollet S. (1997) Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol.* 37: 101-106.
- Parry J.M. (1988) Studies upon the genetic effects of environmental chemicals: the coordinated research programme of the European Economic Community. *Mutagenesis* 3 (2): 105-136.
- Pizarro F., Calvo E. (2009) El significado a mediano y largo plazo de la deficiencia de hierro y zinc durante los primeros dos años de vida, para asegurar un buen crecimiento temprano. En: Uauy R., Carmuega E., Barker D. (Eds.) Impacto del crecimiento y desarrollo temprano sobre la salud y bienestar de la población: Perspectivas y Reflexiones desde el Cono Sur. Primera Ed. Instituto Danone, Cono Sur, Buenos Aires, pp. 49-64.
- Record I.R., Jannes M., Dreosti I.E. (1996) Protection by zinc against UVA and UVB-induced cellular genomic damage in vivo and in vitro. *Biol. Trace Elem. Res.* 53: 27-43.
- Richard M.J., Guiraud M.T., Leccia M.T., Beani J.C., Favier A. (1993) Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts towards oxidant stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 37: 187-199.
- Rosado J.L. (1998) Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Mex.* 40: 181-188.
- Ruz M., Castillo-Duran C., Lara X., Codoceo J., Rebolledo A., Atalah E. (1997) A 14-mo zinc-supplementation trial in apparently healthy Chilean preschool children. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1406-1413.
- Sandstead H.H. (2000) Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutr.* 130: 347S-9S.
- Sharif R., Thomas P., Zalewski P., Graham R.D., Fenech M. (2011) The effect of zinc sulphate and zinc

- carnosine on genome stability and cytotoxicity in the WIL2- NS human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.* 720: 22-33.
- Sharif R., Thomas P., Zalewski P., Fenech M. (2012) The role of zinc in genomic stability. *Mutat. Res.* 733: 111-121.
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. (1998) Selective entrapment of extra chromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol.* 140: 1307-1320.
- Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. (2000) Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.* 448: 81-90.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Sliwinski T., Czechowska A., Kolodziejczak M., Jajte J., Wisniewska-Jarosinska M., Blasiak J. (2009) Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells. *Cell Biol. Int.* 33: 542-547.
- Solomons N.W. (1998) Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity. *Nutr. Rev.* 56: 27-28.
- Song Y., Elias V., Loban A., Scrimgeour A.G., Ho E. (2009a) Marginal zinc deficiency increases oxidative DNA damage in the prostate after chronic exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 48: 82-88.
- Song Y., Leonard S.W., Traber M.G., Ho E. (2009b) Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J. Nutr.* 139: 1626-1631.
- Song Y., Chung C.S., Bruno R.S., Traber M.G., Brown K.H., King J.C., Ho E. (2009c) Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 321-328.
- Sunderman F.W. Jr. (1995) The influence of zinc on apoptosis. *Ann. of Clin. Lab. Sci.* 25: 134-142.
- Szuster-Ciesielska A., Stachura A., Slotwinska M., Kaminska T., Sniezko R., Paduch R., Abramczyk D., Filar J., Kandefer-Szerszen M. (2000) The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145: 159-171.
- Tapisso J.T., Marques C.C., Mathias L., Ramalhinho G. (2009) Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus musculus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutat. Res.* 678: 59-64.
- Umegaki K., Fenech M. (2000) Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15 (3): 261-269.
- Urrutia R. (1997) Exploring the role of the homeobox and zinc finger proteins in pancreatic cell proliferation, differentiation and apoptosis. *Int. J. Pancreatol.* 22: 1-14.
- Walsh C.T., Sandstead H.H., Prasad A.S., Newberne P.M., Fraker P.J. (1994) Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ. Health Perspect.* 102 (2): 5-46.
- Watkins M.L., Erickson J.D., Thun M.J., Mulinare J., Heath C.W. (2000) Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *Am J. Epidemiol.* 152 (2): 149-162.
- Wise S.S., Holmes A.L., Qin Q., Xie H., Katsifis S.P., Thompson W.D., Wise Sr. J.P. (2010) Comparative genotoxicity and cytotoxicity of four hexavalent chromium compounds in human bronchial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 23: 365-372.
- Wu J., Lyons G.H., Graham R.D., Fenech M. (2009) The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis* 24: 225-232.

Xie H., Holmes A.L., Young J.L., Qin Q., Joyce K., Pelsue S.C., Peng C., Wise S.S., Jeevarajan A.S., Wallace W.T., Hammond D., Wise Sr. J.P. (2009) Zinc chromate induces chromosome instability and DNA double strand breaks in human lung cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234: 293-299.

Yamaguchi S., Miura C., Kikuchi K., Celino F.T., Agusa T., Tanabe S., Miura T. (2009) Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 10859-10864.

Yan M., Song Y., Wong C.P., Hardin K., Ho E. (2008) Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. *J. Nutr.* 138: 667-673.

Zhang S., Hunter D.J., Hankinson S.E., Giovannucci E.L., Rosner B.A., Colditz G.A., Speizer F.E., Willett W.C. (1998) A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA* 281: 1632-1637.

EFFECT OF WATERCRESS ON INDUCED DNA DAMAGE, DNA REPAIR AND P-GLYCOPROTEIN ACTIVITY IN HUMAN LYMPHOCYTES

EFFECTO DEL BERRO SOBRE EL DAÑO INDUCIDO AL ADN, LA REPARACIÓN DEL ADN Y LA ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA P EN LINFOCITOS HUMANOS

Casanova N.A.¹, Wagner M.L.², López Nigro M.M.¹, Carballo M.A.^{1*}

¹ CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica) -

INFIBIOC (Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica). Departamento de Bioquímica Clínica.

² Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), Universidad de Buenos Aires (UBA).

Junín 956 (1113), Buenos Aires, Argentina.

*Author for correspondence

macarballo@ffyb.uba.ar

ABSTRACT

Cruciferae vegetables are widely studied due to their potential anticarcinogenic properties. In the present work we analyzed the antigenotoxic effect of watercress (*Nasturtium officinale*, W. Aiton), a member of this family. The vegetal was processed, and the juice obtained was evaluated in relation with genetic material protection and DNA repair capacity against two deleterious agents: mitomycin C and hydrogen peroxide. The antigenotoxic properties were analyzed through cytokinesis block micronucleus test and comet assay (standard and with endonuclease), respectively. Besides, we tested the functionality of P-glycoprotein in human lymphocytes exposed to the whole extract. Watercress had no effect on mitomycin cytostatic effect ($p > 0.05$) and although a decrease trend in micronuclei frequency was observed no statistical difference was found. In relation to DNA repair, a reduction in damage index was observed ($p < 0.001$) since 4 hours of incubation with the juice but it did not reduce the number of oxidized pyrimidines. Respect to P-glycoprotein transporter, our results indicate that the juice of watercress did not change the activity of protein. In conclusion, to better understand the real beneficial effect of watercress *in vitro*, further studies are needed to elucidate the mechanism behind the chemopreventive effect observed.

Key words: chemopreventive effects, comet assay, micronucleus test, transporters, *Nasturtium officinale*

RESUMEN

Las crucíferas son ampliamente estudiadas dado sus potenciales propiedades anticarcinogénicas. En el presente trabajo, analizamos el efecto antigenotóxico del berro (*Nasturtium officinale*, W. Aiton), un miembro de esta familia. El vegetal fue procesado y el jugo obtenido fue evaluado en relación a la protección y reparación del daño al material genético inducido por dos agentes deletéreos: mitomicina C y peróxido de hidrógeno. Las propiedades antigenotóxicas fueron analizadas a través del test del micronúcleo con bloqueo de la citocinesis y el ensayo cometa (estándar y con endonucleasa), respectivamente. Además, evaluamos la funcionalidad de la glicoproteína P en linfocitos humanos expuestos al extracto completo. El berro no modificó el efecto citostático de la mitomicina ($p > 0,05$) y si bien se determinó una tendencia decreciente en la frecuencia de micronúcleos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En relación a la reparación del ADN, se determinó una disminución del índice de daño ($p < 0,001$) a partir de las cuatro horas de exposición al jugo sin existir cambios en el número de pirimidinas oxidadas. Respecto del transportador, nuestros resultados indican que el jugo de berro no modifica la actividad de la proteína. En conclusión, para lograr entender con mayor claridad el beneficio real del berro *in vitro*, es necesario realizar otros estudios con el fin de elucidar el mecanismo subyacente a los efectos quimiopreventivos observados.

Palabras clave: efectos quimiopreventivos, ensayo cometa, test del micronúcleo, transportadores, *Nasturtium officinale*

Fecha de recepción: 08/07/2014

Fecha de aceptación de versión final: 22/10/2014

INTRODUCTION

Cruciferous vegetables are widely studied due to their potential anticarcinogenic properties attributed mainly to phytochemicals derived from glucosinolates. Different evidence derived from *in vitro* and *in vivo* studies has indicated that these vegetables may reduce oxidative DNA damage, induce phase 2 enzymes activities, cell cycle arrest and apoptosis in cancer cell lines and inhibit some members of CYP family (Hayes *et al.*, 2008). However, controversial effects have been detected for isothiocyanates, their metabolites. These phytochemicals enhanced cellular protection against deleterious agents and environments, but also induced cytotoxic effects and oxidative stress in several cell lines (Huang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005).

Previous reports of our laboratory illustrate that watercress juice (*Nasturtium officinale*, W. Aiton) does not act as a genotoxic agent to human lymphocytes *in vitro* (Casanova *et al.*, 2010) furthermore it has a protective effect against DNA damage induced by hydrogen peroxide *in vitro* (Casanova and Carballo, 2011) and cyclophosphamide *in vivo* (mice) (Casanova *et al.*, 2013). Meanwhile, other groups demonstrated that consumption of watercress modulates superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities *in vitro* and *in vivo* (Hoffman *et al.*, 2009) in addition to decrease of oxidative DNA damage (Gill *et al.*, 2007). More recent, another study showed that diet supplementation with this cruciferous attenuates DNA damage and lipid peroxidation induced by exhaustive exercise (Fogarty *et al.*, 2012).

The use of many components of the diet as supplements or therapeutic agents is not a totally safe practice. The chemicals could interact between them or even with drugs leading to toxic effects or therapeutic failure. The outcome will depend on characteristics of the plant, patient and drug. The membrane transporters, like P-glycoprotein or multidrug resistance proteins, play important roles in absorption, distribution and elimination of xenobiotics. P-glycoprotein is expressed in many normal tissues including blood cells and there are evidences that phenethyl isothiocyanate (PEITC) present in watercress inhibited P-glycoprotein activity in human breast cell lines but it may not be a substrate for this protein (Ji and Morris, 2005).

In the present study, we studied the antigenotoxic activity of watercress juice against two genotoxic agents with different mechanism of action: mitomycin C (MMC)

and hydrogen peroxide-induced DNA damage using the cytokinesis-block micronucleus and standard and modified comet assays respectively. In addition, we evaluated the functionality of P-glycoprotein in human lymphocytes exposed to the extract.s.

MATERIAL AND METHODS

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

Watercress juice

Watercress was purchased from organic market garden located in Luján, Buenos Aires. The juice of cress plant (leaves) was prepared with a commercial processor on ice and protected from light exposure. Then it was centrifuged at 10,000 g, for 20 minutes at 4 °C and the supernatants were clarified, sterilized by microfiltration using 0.22 µm pore membranes (Millipore) aliquoted. A single batch preparation with a concentration of 6.5 g watercress/ml juice was freezed until use.

Phytochemical screening

The juice was subjected to quantitative chemical screening for the identification of the major classes of active chemical constituents. The phytochemical profile was determined according to methodology described (Portmann *et al.*, 2012) and includes determination of total phenols, tannins, and flavonoids content. All measurements were done in triplicate.

Total phenols were determined by Folin-Ciocalteu procedure as other have done (Makkar *et al.*, 1993) at 725 nm. The amount of total phenols was expressed as µg tannic acid/g material. Calibration curve of tannic acid was developed.

Total tannin content was determined by Folin-Ciocalteu procedure, after the removal of tannin by precipitation with bovine serum albumin. Non absorbed phenolics were determined as described for total phenols. Calculated values were subtracted from total phenol contents and total tannin contents expressed as µg tannic acid/g material.

Flavonoids were measured adding aluminum chloride and sodium acetate (flavonoids reactive) to aliquots of juice. After incubation at room temperature, absorbance was recorded at 430 nm. Calibration curve of rutin was

developed. The amount of flavonoids was calculated as μg rutin/g material (Maksimovic *et al.*, 2005).

The total intact glucosinolate content of juice has been studied by reverse-phase HPLC-UV (Gilson 170 chromatograph equipped with a diode array detector, wavelength 254 nm) using a Gemini S4 C18 column with mobile phase composed of 30% sodium monobasic phosphate 0.01M/70% methanol (flow rate: 1.5ml/min) and reported earlier (Casanova *et al.*, 2013).

Evaluation of protection capacity against DNA damage: cytome assay

Human lymphocytes were isolated using Ficoll-Paque (GE Healthcare) density gradients (Boyum, 1964). Briefly, blood was diluted with phosphate buffered saline and layered onto Ficoll-Paque (4:3). The blood was centrifuged for 20 minutes at 800 g; the lymphocyte layer was removed and washed twice in phosphate buffered saline (PBS). Cell density was counted with a hemocytometer. The lymphocyte cultures (1×10^6 cells/ml) were grown in RPMI 1640 (Gibco BRL) supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco BRL) and phytohemagglutinin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PHA) in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C in polystyrene plates. The watercress juice or PBS were added to cultures at 20 h after PHA stimulation, followed by the addition of MMC (final concentration of 0.152 μM) at 44 h and cytochalasin B (4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 48 h. At 72 h, lymphocytes cultures were spun directly onto glass slides using a cytocentrifuge (200 g, 5 minutes; Shandon, Cytospin 3, Microlat). Slides were allowed to air dry before methanol fixation at room temperature for 10 min. Before scoring slides were stained with giemsa 10% (Merck).

At least 2,000 binucleated lymphocytes were scored for the number of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds. The proportion of mono, bi and multinucleated cells was used to determinate cytostatic effects through the nuclear division index (NDI) = $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)/N$, where n_1 - n_4 represent the number of cells in with 1, 2, 3 or 4 nuclei and N is the total number of viable cells evaluated. Percentage of necrotic and apoptotic cells were measured to establish cytotoxic effects (Fenech, 2007).

Evaluation of in vitro repair capacity and endonuclease III sensitive sites using the comet assay

The procedure described earlier (Bowden *et al.*, 2003) was used with modifications. Heparinized samples of

peripheral blood were obtained from healthy donors as a source of leucocytes. H_2O_2 treatment was done before cells were incubated with the juice. Briefly, cells (50 μl) were treated with H_2O_2 (25 μM) for 10 min on ice to induce DNA strand breaks. The reaction was quenched using 2% DMSO (Merck) solution in PBS. Each sample was washed and then incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 15% fetal bovine serum and the watercress juice (13.2 mg/ml or 26.4 mg/ml) for 0, 2, 4 or 6 hours at 37 °C. Each sample was centrifuged; cell pellets were mixed with 200 μl of 1% low melting point agarose solution at 37 °C and spread onto slides precoated with 1% normal melting point agarose. The slides were submerged in cold, freshly prepared lysis solution (2.5M NaCl, 100mM Na_2EDTA , 10mM trizma, 1% triton X-100 and DMSO 10%, pH 10) and left overnight at 4 °C. The slides were placed in cold electrophoresis alkaline buffer (10N NaOH, 200mM Na_2EDTA , pH >13) and the embedded cells were exposed for 20 min to allow DNA unwinding to occur, before electrophoresis at 25V and 300mA (0.75V/cm) for 20 min. The slides were then washed with neutralization buffer (Tris 0.4M, pH 7.5) and the DNA stained with ethidium bromide (0.02 mg/ml) and observed using a fluorescent microscope at 40 \times of magnitude. All procedures were carried out in the darkness and on ice to avoid additional DNA damage and inhibit DNA repair, respectively. Cell viability was determined by means of the ethidium bromide/acridine orange assay (Mercille and Massie, 1994). One hundred randomly selected cells (for duplicate) were analyzed visually on a scale of 1-4, depending on the grade of damage, to calculate the Damage Index (DI) = $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, where n is the number of cells in each category evaluated.

The slides were washed twice with enzyme buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, pH 8.0) for 5 minutes, to evaluate the levels of oxidized pyrimidines. Then, the gels were incubated for 30 minutes with 50 μl of Endo III or 50 μl of buffer at 37 °C. The following steps were done according to the standard protocol. The levels of Endo III sensitive sites (ESS) were calculated as the damage index obtained with enzyme minus the score without enzyme.

The correlation between visual scoring and computer-based image analysis has been established; there is a good correlation between visual score and image analysis parameters (Dusinska and Collins, 2008). All the slides were coded and scored by the same observer.

Modulation of P-glycoprotein activity

Human lymphocytes were isolated using Ficoll-Paque density gradients as described above. 5×10^5 cells were incubated with rhodamine 123 for 10 minutes in the dark and washed twice with cold PBS. Then, they were incubated at 37 °C with culture medium supplemented with fetal bovine serum and watercress juice for 3 hours. Cells were washed, resuspended in PBS and kept on ice until analysis. Verapamil (100 mM) was used as a positive control because it is an inhibitor of P-glycoprotein. Fluorescence intensity was measured in lymphocytes region (10,000 events) with a FAC-SCAN Ortho-Cyturon cytometer. Geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of each sample was taken from the histogram. The results were expressed as a proportion of basal score.

Statistical analysis

Differences between controls and treatments were analyzed by one-way analysis of variance and a post-hoc Student Newman Keuls test. The significance of correlation between Endo III sensitive sites and damage index was estimated by Pearson correlation test. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant for all the endpoints evaluated (Sigma Stat software).

RESULTS

The phytochemical profile of *Nasturtium officinale* juice indicated the presence of phenols, tannins and flavonoids (Table 1). Besides, the juice contains 8.9 μmol total intact glucosinolates/ml material.

In relation with antigenotoxic activity of watercress, we evaluated its ability to protect and repair DNA damage induced by two genotoxic agents. Respect to mitomycin C, Table 2 and Figure 1 show the results of protective potential obtained with the micronucleus test. Watercress had no effect on MMC cytostatic effect ($p > 0.05$) and although a decreasing trend in micronuclei frequency was observed no statistical difference was found ($p > 0.05$). There was no difference between watercress-treated and MMC-control group in relation with nucleoplasmic bridges and nuclear buds ($p > 0.05$). In addition, neither apoptotic nor necrotic cells were detected.

Table 1. Quantitative estimation of phytochemicals ($\mu\text{g/g}$).

Phytochemical (X \pm SD)	
Phenols	285 \pm 20
Tannins	42 \pm 14
Flavonoids	146 \pm 3.54

Table 2. Nuclear division index of human lymphocytes exposed to watercress juice and/or mitomycin C.

Treatment	NDI (X \pm SD)
Negative control (PBS)	1.66 \pm 0.08 *
Positive control (MMC 0.152 μM)	1.53 \pm 0.03
13.2 mg/ml WJ + MMC 0.152 μM	1.52 \pm 0.07
26.4 mg/ml WJ + MMC 0.152 μM	1.52 \pm 0.06

The ability of human leucocytes to repair strand breaks induced by H_2O_2 was measured at different times (0, 2, 4 and 6 hours). Since no statistical difference was found between volunteers, the data were pooled. Figure 2 shows the effect of watercress juice on DNA repair. For both concentrations, a decrease in DI was observed ($p < 0.001$); the antigenotoxic effect was observed after 4 hours of incubation with the juice. We continued the analysis of the repair process and detected that damage decreased with time so that after 24 hours the levels of breaks were not statistical different in relation to the control (treated with saline solution) (data not shown). Although our results show that watercress juice did not reduce the number of oxidized pyrimidines induced in leucocytes by exposure to hydrogen peroxide there was a positive association between ESS and DI (Table 3: $p > 0.05$, Figure 3: $p < 0.001$).

Respect to the functionality assay of P-glycoprotein in human lymphocytes, the expression of results suggests that addition of watercress juice to cellular suspension does not impact on the rhodamine transport ($p > 0.05$) whereas verapamil has an inhibitor effect ($p < 0.05$) (Table 4).

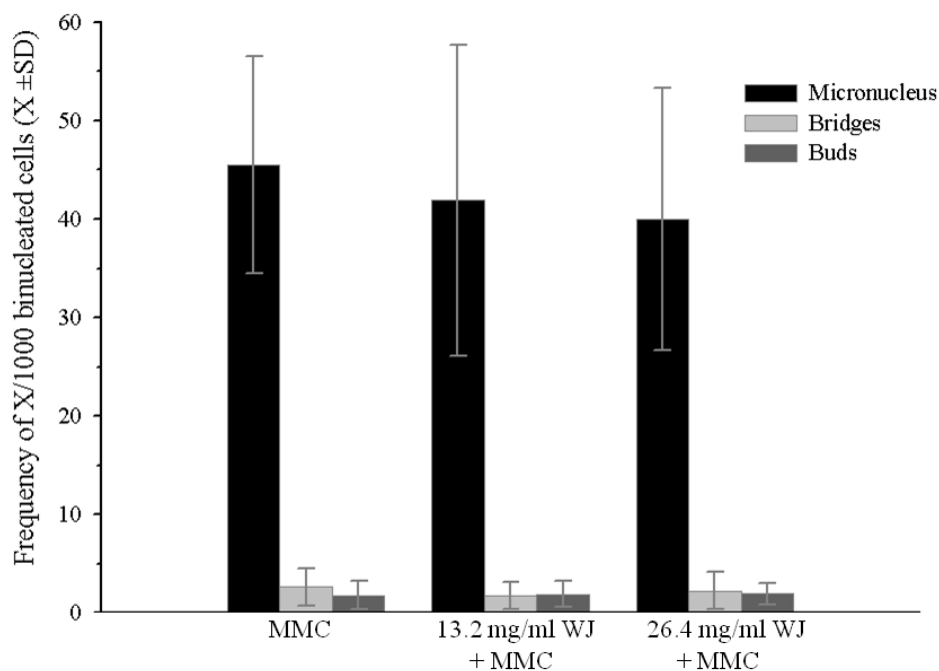


Figure 1. Micronucleus, nucleoplasmic bridges and nuclear buds frequencies of human lymphocytes exposed to watercress juice and/or mitomycin C.
 X: Micronucleus, nucleoplasmic bridges or nuclear buds.
 MMC: mitomycin C 0.152 μM.
 WJ: watercress juice.
 ANOVA NS

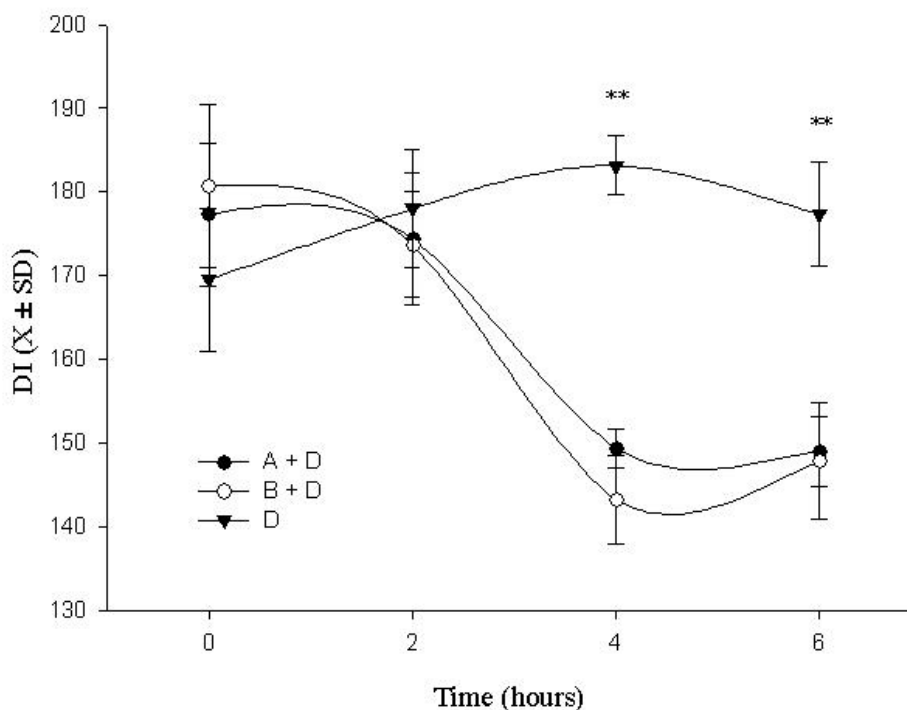


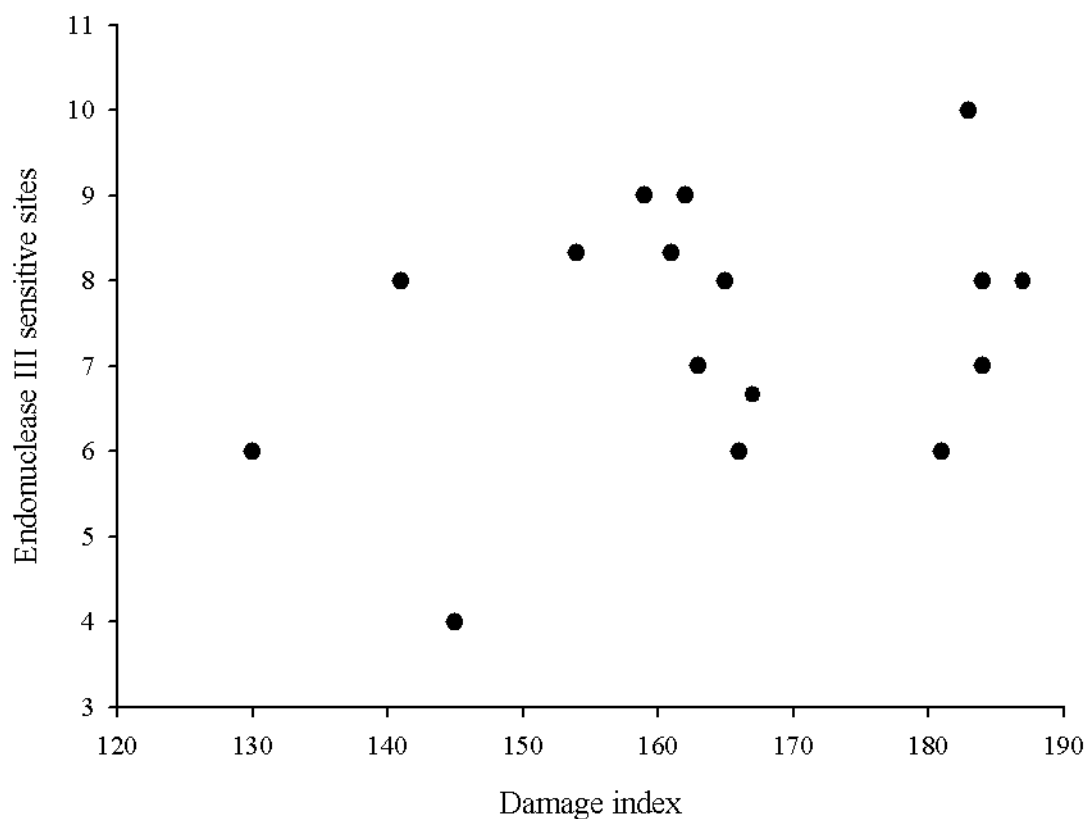
Figure 2. Antigenotoxic effect of watercress juice on DNA damage.
 A + D: Watercress juice 13.2 mg/ml + H₂O₂ 25μM.
 B + D: Watercress juice 26.4 mg/ml + H₂O₂ 25μM.
 D: H₂O₂ 25μM.
 ** p < 0.001 (ANOVA, post test: Student-Newman-Keuls).

Table 3. Level of Endonuclease III sensitive sites.

Time (h)	ESS (X ± SD)		
	A + D	B + D	D
0	8 ± 1	7 ± 2	9 ± 1
2	7 ± 1	8 ± 3	9 ± 2
4	8 ± 4	6 ± 2	12 ± 2
6	11 ± 1	7 ± 3	10 ± 3

Table 4. Effect of watercress on P-glycoprotein activity.

Treatment	GMFI (X ± SD)
Positive control (verapamil 100 µM)	4.19 ± 0.94*
13.2 mg/ml WJ	1.02 ± 0.13
26.4 mg/ml WJ	1.08 ± 0.27

**Figure 2.** Association between Endonuclease III sensitive sites and damage index
 $\rho = 0.786$; $p < 0.001$

DISCUSSION

In the last decades, the use of medicinal plants and components of the diet as chemopreventive agents has increased. It is important to highlight that effects always depend on plant's species, its origin and growing conditions, its composition, extract preparation, extraction method, doses and matrix analyzed. Nowadays, it is believed that the beneficial characteristics attributed to some vegetables are due to the presence of diverse phytochemicals which exert their effects by multiple mechanisms.

The micronucleus test is a useful method to detect genotoxic and cytotoxic effects and it can be adapted to establish a relationship between nutrition and DNA damage (Bull *et al.*, 2011). In the present study, we evaluated potential capacity of a diet component to protect against MMC-induced damage. The treatment with watercress juice, at both concentrations, reduced micronucleus frequency compared to those obtained with the mutagenic agent. However, these trends had not statistical significance which could be due to the short period of intervention used or very different response detected in the human samples (individual susceptibility) that disables the statistical evaluation.

The results of repair capacity evaluated by comet assay show that the extract exerted antigenotoxic activity against oxidative damage after 4 hours of incubation at both concentrations used. This effect may be related to the antioxidant capacity of watercress and to a combination of bioactive substances, acting at different targets and via different mechanisms. The amount of oxidized pyrimidines in DNA was used as a specific biomarker of oxidative damage. Although no difference was found at level of modified bases between controls and treated groups we detected a positive correlation between ESS and DI. This indicates watercress enhanced DNA repair process and it could be related with the modification of several enzymes involved in oxidative stress process. Supplementary studies may explain this situation.

It has to be mentioned that other authors have reported that watercress supplementation reduces the level of oxidized purines in lymphocytes (Gill *et al.*, 2007). The discrepancy may be ascribed to the presence of some constituents in the whole plant that may be absent, or in minor proportion in our juice. Otherwise the experimental design used is so different that the results are not equivalent.

The contradictory results of MN and comet assays

are related to different end-points detected. The first one determines unrepaired DNA damage or spindle mistakes while the comet assay detects strand breaks and labile sites which could be easily repairable. Both methods are widely used as biomarkers of the relationship between diet and disease or health.

Taking account that isothiocyanates interact with P-glycoprotein and other transporters, consume of watercress could modulate their activities, influence the pharmacokinetics of drugs and change therapy outcomes (Rodrigues Frago *et al.*, 2011). Our data suggest that the intake of the vegetal may be not inducing changes in the bioavailability of drugs in opposition with isolated PEITC.

In conclusion, to better understand the real beneficial effect of watercress *in vitro*, further studies are needed to elucidate the mechanism behind the chemopreventive effect observed.

REFERENCES

- Bowden R.D., Buckwalter M.R., McBride J.F., Johnson D.A., Murray B.K., O'Neill K.L. (2003) Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mutat. Res.* 537: 1-9.
- Bøyum A. (1964) Separation of white blood cells. *Nature* 204: 793-794.
- Bull C.F., Beetstra-Hill S., Benassi-Evans B.J., Crott J.W., Kimura M., Teo T., Wu J., Fenech M.F. (2011) Review: Application and adaptation of the *in vitro* micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis* 26 (1): 193-197.
- Casanova N.A., Ariagno J.I., López Nigro M.M., Mendeluk G.R., Gette M.A., Petenatti E., Palaoro L.A., Carballo M.A. (2013) *In vivo* antigenotoxic activity of watercress juice (*Nasturtium officinale* L.) against induced DNA damage. *J. Appl. Toxicol.* 33 (9): 880-885.
- Casanova N.A., Carballo M.A. (2011) Antigenotoxic activity of watercress extract in an *in vitro* mammalian system using comet assay. *Phytother. Res.* 25 (12): 1743-1746.

- Casanova N.A., López Nigro M.M., Curieses S.P., Carballo M.A. (2010) *In vitro* evaluation of genotoxicity of watercress through effect biomarkers considering human intake. *Lat. Am. J. Pharm.* 29 (7): 1120-1125.
- Dusinska M., Collins A.R. (2008) Review: The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23 (3): 191-205.
- Fenech M.F. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2 (5): 1084-1104.
- Fogarty M.C., Hughes C.M., Burke G., Brown J.C., Davison G.W. (2012) Acute and chronic watercress supplementation attenuates exercise-induced peripheral mononuclear cell DNA damage and lipid peroxidation. *Brit. J. Nutr.* 109 (2): 293-301.
- Gill C.I., Haldar S., Boyd L.A., Bennett R., Whiteford J., Butler M., Pearson J.R., Bradbury I., Rowland I.R. (2007) Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 504-10.
- Hayes J.D., Kelleher M.O., Eggleston I.M. (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur. J. Nutr.* 47 (2): 73-88.
- Hoffman T., Kuhnert A., Schubert A., Gill C.I., Rowland I.R., Pool-Zobel B.L., Gleit M. (2009) Modulation of detoxification enzymes by watercress: *in vitro* and *in vivo* investigations in human peripheral blood cells. *Eur. J. Nutr.* 48: 483-491.
- Huang C., Ma W.Y., Li J., Hecht S.S., Dong Z. (1998) Essential role of p53 in phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis. *Cancer Res.* 58 (18): 4102-4106.
- Ji Y., Morris M.E. (2005) Transport of dietary phenethyl isothiocyanate is mediated by multidrug resistance protein 2 but not P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 70: 640-647.
- Makkar H., Blüemmel M., Borowy N., Becker K. (1993) Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61 (2): 161-165.
- Maksimovic Z., Malencic D., Covacevic N. (2005) Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. *Biores. Technol.* 96 (8): 873-877.
- Mercille S., Massie B. (1994) Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hydridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 1140-1154.
- Portmann E., López Nigro M.M., Reides C.G., Llesuy S., Ricco R.A., Wagner M.L., Gurni A.A., Carballo M.A. (2012) Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *Int. J. Toxicol.* 31 (2): 192-202.
- Rodríguez-Fragoso L., Martínez-Arismendi J., Orozco-Bustos D., Reyes-Esparza J., Torres E., Burchiel S. (2011) Potential risks resulting from fruit/vegetable-drug interactions: effects on drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *J. Food Sci.* 76 (4): 112-124.
- Zhang Y., Li J., Tang L. (2005) Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 38 (1): 70-77.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge to University of Buenos Aires for grant [UBACYT 20020100100123 2011-2014] and to PhD Catalina Cortada for her help in the P-glycoprotein functionality assay.

REGISTRO DE CULTIVAR CUMÉ-UNRC

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

Facultad de Agronomía y Veterinaria, UN de Río Cuarto.

e-mail: egrassi@ayv.unrc.edu.ar

Cumé-UNRC es un cultivar de Triticale (*x Triticosecale* Wittmack), $2n=6x=42$, desarrollado en el Criadero A/1739 UNINARC perteneciente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UN de Río Cuarto, Córdoba, e inscripto en el Registro Nacional de Cultivares del INASE. Resolución N° 407/2013 del 18/10/2013. Obtentores: V. Ferreira, E. Grassi y B. Szpiniak.

Fecha de recepción: 02/10/2014
Fecha de aceptación de versión final: 10/10/2014

Origen, proceso de selección y modos de empleo

Línea derivada de la introducción heterogénea original Kiss-IRA, producto del cruzamiento X15692-C-0Y realizado en CIMMYT, México. Probada durante seis años en ensayos propios de producción de pasto y grano forrajero. Por selección individual se obtuvieron líneas homocigóticas. Una de ellas se destacó por su aptitud para la producción temprana de pasto dando origen a Cumé-UNRC, que se desarrolló a partir de una planta individual.

Previo a su registro, la línea fue estudiada en ensayos comparativos de rendimiento con diseño en bloques completos aleatorizados utilizando como testigos los cultivares Genú, Tizné y Quiñé-UNRC. Los datos se analizaron mediante ANAVA y prueba de Duncan para diferencia de medias. Fue incluida en ensayos de experimentación adaptativa en las EEA INTA de Gral. Villegas, Marcos Juárez, Paraná, Concepción del Uruguay, Bordenave y G. Covas (Anguil). De acuerdo al historial de selección y las pruebas efectuadas se considera apto para emplear en la región pampeana subhúmeda-semiárida tanto para pastoreo directo como para la confección de rollos cortando en estado de grano lechoso pastoso, y como grano forrajero.

Pureza varietal

Se mantiene en el Criadero UNINARC; anualmente se realiza selección individual de una planta tipo en jaula fitotécnica, siembra de espiga a surco en jaula fitotécnica y de surco a parcela prebásica a campo. La semilla fundación se obtiene en lotes de 6 x 24 m, donde por selección masal se eliminan las plantas fuera de tipo desde el estado fenológico 61 (comienzos de floración) hasta el 92 (grano duro) (Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. CIMMYT, México).

Ciclo vegetativo

Cultivar de ciclo intermedio, porte juvenil semierecto, vigoroso crecimiento inicial y buena sanidad durante todo el ciclo de aprovechamiento forrajero. Especialmente apto para encadenar con otros cultivares o especies de entrega más tardía durante el invierno. El ciclo

emergencia a floración plena en siembras para grano es de 120 ± 6 días, y de 165 ± 5 días a madurez de cosecha, dependiendo de las condiciones climáticas del año. Es sensible al fotoperíodo y con moderados requerimientos de frío. La altura de planta a la madurez es de 105 ± 10 cm dependiendo principalmente la disponibilidad de agua durante el ciclo vegetativo. Variedad similar a Genú-UNRC, pero de ciclo emergencia-floración ocho días más largo y a Quiñé-UNRC con cinco días promedio de ciclo más corto. En siembras para grano, el ciclo es 15 días más largo que el de Tizné-UNRC. Difiere de los anteriores en la mayor entrega de forraje en el primer aprovechamiento. La producción de biomasa no presenta diferencias estadísticamente significativas con los cultivares anteriores. Follaje verde claro similar a Tizné-UNRC; de mayor pilosidad en el cuello de la espiga que este última y menor que Quiñé-UNRC.

La fecha de siembra adecuada para la producción de forraje en la región pampeana subhúmeda seca y semiárida es la primera quincena de marzo. También se puede emplear en regiones más húmedas con la misma fecha de siembra para su correcto aprovechamiento. La densidad de siembra se debe ajustar para obtener 200 plantas m^2 a la emergencia. Las siembras para grano deben ser en el mes de junio. Se logran buenos resultados con riego suplementario de 40-50 mm en macollaje.

Producción de materia seca y grano

La producción de materia seca no difiere significativamente de la de otros cultivares registrados por la UNRC. La principal característica distintiva de Cumé-UNRC refiere a la distribución del forraje a lo largo del ciclo de producción, ya que entrega más de 50% de la biomasa total en el primer corte. Esto permite realizar un rápido aprovechamiento y desocupar tempranamente el lote para su utilización con cultivos primavera-estivales. La producción de grano no difiere significativamente de la de Quiñé y Tizné-UNRC. La biomasa aérea y de grano en ensayos efectuados durante tres años en Río Cuarto, siete en Marcos Juárez, cuatro en Paraná y tres en Gral. Villegas se resume en el Cuadro 1. El cultivar se caracterizó como de doble propósito debido a su adecuado balance de producción de forraje y posterior cosecha de grano.

Cuadro 1. Valores medios y significación para producción de materia seca, distribución de la biomasa aérea seca en cada corte y producción de grano de Cumé-UNRC y testigos.

Cultivar	1 ^{er} corte		2 ^{do} corte		3 ^{er} corte		Total	Grano tn.ha ⁻¹
	tn.ha ⁻¹	%	tn.ha ⁻¹	%	tn.ha ⁻¹	%		
Cumé-UNRC	1,72 a	52,7 a	1,09 a	30,8 a	0,60 c	16,6 b	3,41 a	1,44 bc
Quiñé-UNRC	1,73 a	49,1 ab	1,23 a	32,6 a	0,70 ab	18,3 ab	3,65 a	1,48 bc
Tizné-UNRC	1,68 a	47,3 abc	1,31 a	35,0 a	0,69 abc	17,7 ab	3,68 a	1,72 ab
Genú-UNRC	1,72 a	42,8 bc	1,45 a	34,4 a	1,00 a	22,8 ab	4,17 a	1,96 a

Letras iguales en la misma columna indican diferencias no significativas al 5%.
La interacción cultivar*año para Rendimiento de grano fue significativa (F=5,36***).

Cumé-UNRC tiene grano ovalado, levemente arrugado, de color ámbar, con relieve dorsal cóncavo, Peso de 1.000 granos= $29,30 \pm 2,53$ g y Peso Hectolítrico= $63,20 \pm 3,53$ kg.hL⁻¹, promedios de tres años, valores que lo definen como sólo apto para uso forrajero.

Comportamiento frente a factores adversos

Tolera la sequía invernal, resiste las heladas durante el período juvenil y es susceptible en floración. Durante el ciclo vegetativo presenta moderada resistencia a *Puccinia recondita* (roya de la hoja) y baja incidencia de la enfermedad; también es baja la incidencia de “manchas foliares” (producidas por patógenos no determinados). En ningún caso los ataques comprometen la cantidad y calidad del forraje producido hasta hoja bandera. No se ha registrado presencia de otras royas, carbonos o fusariosis. No se desgrana ni arrebatata; el vuelco por tormentas primaverales con fuertes vientos puede alcanzar un máximo de 20%.



Prefloración



Espigas



Espiguillas



Granos





KATSUO ARMANDO OKADA

1935 - 2014

El pasado 16 de agosto fallece en la ciudad de Mar del Plata, Katsuo Armando Okada, brillante botánico argentino dedicado al cultivo de la papa. Armando o Katsuo, como lo llamamos indistintamente sus amigos, nació en 1935 en Villa María, Córdoba, en una familia típicamente argentina: un inmigrante japonés y una criolla. En sus conversaciones, Armando siempre recordaba la naturaleza férrea y estricta de su padre, que sin duda contribuyó a formar su carácter aportando su incansable pasión emprendedora (en el PROPAPA lo llamábamos San Cayetano, el patrono del trabajo, pues repartía tareas para todos nosotros). Su madre le aportó seguramente la sensibilidad social y su amor por la tierra.

Cursó sus estudios en la Universidad Nacional de Buenos Aires y en 1967 se recibió de Licenciado en Biología. En sus inicios profesionales trabajó como botánico en el “Estudio de las enfermedades y deficiencias nutricionales del ganado de la Argentina” en la Estación Experimental Agropecuaria, INTA Balcarce (1964-1967), identificando al “duraznillo blanco” (*Solanum malacoxylon* o *S. glaucophyllum*) como maleza causante de la enfermedad del “enteque seco”.

Entre los años 1967 y 1970 continuó sus estudios y obtuvo el título de Doctor en Ciencias Biológicas en la Universidad de Birmingham, Gran Bretaña, donde trabajó con el Profesor John G. Hawkes. Éste lo introdujo en el mundo de los recursos genéticos de la papa. A su regreso al país continuó su trabajo en el INTA, esta vez como creador y curador del Banco de Germoplasma de *Solanum* tuberíferos y especies forrajeras del INTA Balcarce. En su incursión en la docencia, durante los años 1971-1975, desarrolló la cátedra y fue profesor titular de Botánica Agrícola en la Facultad de Ciencias Agrarias, hoy Universidad Nacional de Mar del Plata.

Armando se dedicó a la investigación del género *Solanum*, publicando varios artículos sobre conservación y evaluación del germoplasma de la papa, estudios citogenéticos de híbridos y variedades poliploides, y colección de papa en el noroeste argentino. En los años 1973 a 1986 realizó trabajos de consultoría en taxonomía de *Solanum* tuberíferos para centros internacionales como *Potato Introduction Station*, ARS, USDA, Sturgeon Bay, Wisconsin, EEUU) y el Centro Nacional de Recursos Genéticos en Brasilia, Brasil. En el año 1988 fue nombrado Coordinador Nacional del Programa

de Recursos Genéticos, participando activamente en la creación del Instituto de Recursos Biológicos (Centro Nacional de Investigaciones de Recursos Naturales) de INTA Castelar.

En 1990 se traslada con su familia a Cali, Colombia donde fue Director Regional para las Américas en el Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IPGRI). En esta gestión crea y desarrolla la Red Andina de Recursos Fitogenéticos (REDARFIT), la Red Amazónica de Recursos Fitogenéticos (TROIPIGEN), la Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos (REMERFI) y el Comité Caribeño para el Manejo de los Recursos Fitogenéticos.

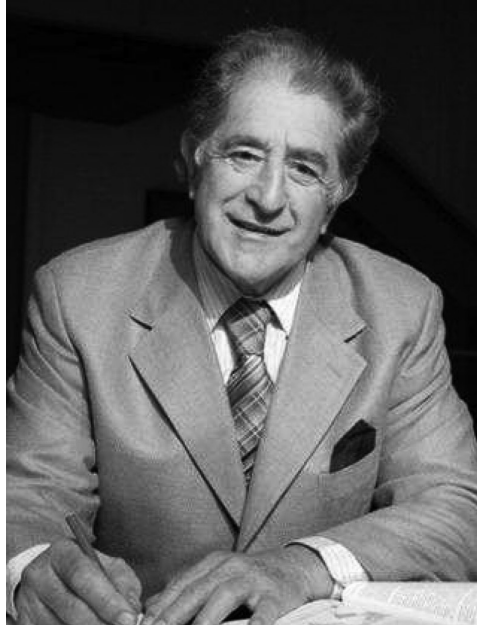
En el año 1996 regresa con su familia a Balcarce. Allí se dedicó a proyectos personales como la floricultura, carpintería, cría de cerdos y granja. En el 2001 integró el grupo ProPapa, donde se dedicó a la generación de proyectos y relaciones públicas, siendo Editor Principal del boletín Actualidad Papera. Esta vez sus proyectos fueron más allá de la cuestión científica y abordaron problemáticas sociales en comunidades marginales del NOA, NEA y Mar del Plata. Desde el PROPAPA fue uno de los organizadores de ALAP2008 en Mar del Plata.

En el año 2009 se retira formalmente de sus labores profesionales y se dedica a sus otras pasiones, como la música clásica, la lectura y los idiomas (inglés y francés). En su ciudad adoptiva tuvo una destacada participación en el Rotary Club de Balcarce con una innumerable cantidad de iniciativas comunitarias.

Los que tuvimos el privilegio de conocerlo y ser su amigo, reconoceremos siempre en Armando su inagotable fuente de iniciativas, su incansable voluntad de trabajo, su honestidad intelectual y su vocación de servicio. Se fue un querido hombre de familia, amigo leal y un gran científico.

Elena Okada y Marcelo Huarte

15 de setiembre de 2014



Ing. Agr. ENRIQUE FRANCISCO ANTONELLI

1932 - 2014

El Ingeniero Agrónomo Enrique Francisco Antonelli nació el 9 de enero de 1932 en la Capital Federal. A temprana edad su familia se mudó a Castelar, donde cursó la primaria en la Escuela 17 de Castelar Sur, y luego sus estudios secundarios en la Escuela Normal de Profesores Mariano Acosta. Ejerció la docencia como maestro primario por un breve tiempo y posteriormente ingresó a la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, donde se graduó en 1959. Ingresó en 1958, siendo estudiante de Agronomía, a la División de Inmunología Vegetal del Instituto de Fitotecnia (actual Instituto de Genética EA Favret del INTA Castelar), formándose profesionalmente con investigadores de la talla de José Vallega, Ewald A. Favret, Hugo Cenoz, Juan Tessi y Noé Horovitz, entre otros, en el campo de la resistencia genética de cereales y oleaginosas a las enfermedades, especialmente royas. Becado por la Fundación Rockefeller cursó estudios en la Universidad de Nebraska (USA) donde se graduó como Master of Science en 1965. En 1968 fue designado Jefe de la División de Inmunología Vegetal del Instituto de Fitotecnia, cargo que ejerció hasta la disolución de la misma en 1989. Fue socio fundador de la Sociedad Argentina de Genética desde el año 1969 y dió la Conferencia “Ewald A. Favret” en el Congreso Argentino de la SAG en Malargüe, Mendoza en el 2004. Desde mayo de 1991 hasta agosto de 1995 se desempeñó como Director interino del Instituto de Genética del INTA Castelar. A lo largo de su extensa actuación el Ing. Antonelli realizó numerosas disertaciones en Congreso y Simposios del país y del exterior, participando también en el dictado de clases sobre temas de su especialidad en varios cursos de post-grado organizados en el país. Fue autor de alrededor de 50 trabajos de investigación, colaborando además en la redacción de capítulos en distintos libros, entre ellos el capítulo *Argentine Wheat Pool* del *Wheat World Book*. Compartió también distintas distinciones con otros autores, como el Premio Bolsa de Cereales 1979, y la Espiga de Oro 1991 de la fiesta provincial del trigo. Fue además integrante del primer Comité Permanente de Cereales y Oleaginosas, organismo asesor de la Comisión Nacional de Semillas (CONASE).

Aunque el Ing. Antonelli fue jubilado en 1997, continuó ejerciendo sus actividades de investigación en el Instituto de Genética por más de una década como profesional asociado y luego como investigador independiente. Investigador incansable, laborioso, con un agudo sentido del humor y vasta cultura, fue una figura señera y entrañable, que dejó una impronta notable, como tantos otros investigadores del Instituto de Genética.

Instituto de Genética Ewald A. Favret

7 de setiembre de 2014