



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
Dept. 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
Dept. 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

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES



Drosophila melanogaster con malformación
en abdomen

Autor: A.M. Palermo



Tricepiro
Autor: H. Paccapelo



Toro Aberdeen Angus
Autor: E. Villegas Castagnaso

ÍNDICE

6 - 15

Article 1 - research

GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF STRIPED WEAKFISH *Cynoscion guatucupa* (SCIAENIDAE) FROM THE SOUTHWESTERN ATLANTIC

ESTRUCTURA GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE LA PESCADILLA DE RED *Cynoscion guatucupa* (SCIAENIDAE) DEL ATLÁNTICO SUDOCCIDENTAL

Alonso M.P., Fernández Iriarte P.J.

16 - 28

Article 2 - research

GENEALOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF AN ARGENTINEAN ANGUS SEEDSTOCK HERD

ANÁLISIS MOLECULAR Y GENEALÓGICO DE UN PLANTEL ARGENTINO DE RODEO ANGUS

Corva P.M., Colavita M.I., Legaz G., Martínez M.

29 - 35

Article 3 - research

D-LOOP MITOCHONDRIAL GENETIC ANALYSIS IN ABEERDEN ANGUS OLD TYPE FROM ARGENTINA

ANÁLISIS GENÉTICO DEL BUCLE D EN ABERDEEN ANGUS TIPO ANTIGUO DE LA ARGENTINA

Villegas Castagnasso E.E., Rogberg-Muñoz A., Prando A.J., Baldo A., Giovambattista G.

36 - 51

Article 4 - research

GENOTYPE-ENVIRONMENT INTERACTION AND STABILITY IN FORAGE YIELD OF TRITCALE AND TRICEPIRO

INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE Y ESTABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE FORRAJE DE TRITICALES Y TRICEPIROS

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

52 - 61

Article 5 - research

SCREENING OF SOYBEAN CULTIVARS FOR CHLORIDE TOLERANCE IN ARGENTINA
TAMIZADO DE CULTIVARES DE SOJA POR TOLERANCIA A CLORUROS EN ARGENTINA

Lúquez J.E., Briguglio M.A., Irigoyen F., Eyherabide G.A.

62 - 74

Article 6 - research

ASSOCIATION BETWEEN GENETIC AND PHENOTYPIC VARIABILITY WITH ADJUSTMENT FOR SPATIAL AUTOCORRELATION IN *Prosopis*
ASOCIACIÓN ENTRE VARIABILIDAD GENÉTICA Y FENOTÍPICA CON AJUSTE POR AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL EN *Prosopis*

Teich I., Mottura M., Verga A., Balzarini M.

75 - 81

Article 7 - research

ACETALDEHYDE INDUCED DEVELOPMENTAL AND GENETIC DAMAGE IN *Drosophila melanogaster*

DAÑO GENÉTICO Y DEL DESARROLLO INDUCIDO POR ACETALDEHIDO EN *Drosophila melanogaster*

Palermo A.M., Mudry M.D.

82 - 95

Article 8 - research

MENDELIAN ANALYSIS OF RESISTANCE/ SUSCEPTIBILITY TO A TRANSPLANTABLE BREAST TUMOR IN A MURINE MODEL

ANÁLISIS MENDELIANO DE LA RESISTENCIA/ SUSCEPTIBILIDAD A UN TUMOR TRASPLANTABLE DE MAMA EN UN MODELO MURINO

Cáceres J.M., Pagura L., Di Masso R.J., Rico M.J., Rozados V.R.

GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF STRIPED WEAKFISH *Cynoscion guatucupa* (SCIAENIDAE) FROM THE SOUTHWESTERN ATLANTIC

ESTRUCTURA GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE LA PESCADILLA DE RED *Cynoscion guatucupa* (SCIAENIDAE) DEL ATLÁNTICO SUDOCCIDENTAL

Alonso M.P.^{1,2,*}, Fernández Iriarte P.J.³

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3250 (7600), Mar del Plata, Argentina.

² CONICET. Unidad Integrada Balcarce (FCA, UNMdP - EEA INTA Balcarce), CC 276, Balcarce (7620), Argentina.

³ IIMYC, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3250 (7600), Mar del Plata, Argentina.

* Author for correspondence
firiarte@mdp.edu.ar

ABSTRACT

In South America, the Pleistocene was characterized by important environmental changes related to glacial cycles, which had significant effects on the evolutionary history of several marine species. To evaluate the pattern of demographic history and the genetic structure of striped weakfish *Cynoscion guatucupa*, a 401 bp fragment of the mitochondrial Cytochrome *b* gene was sequenced from 92 individuals from three coastal areas in Argentina and one in Brazil in the southwestern Atlantic. Haplotype diversity was high, whereas nucleotide diversity was low among all sampling sites. The star-like pattern was not phylogeographically structured, in agreement with the AMOVA analysis. The Fu's test was negative and highly significant whereas the mismatch analysis yielded an unimodal distribution indicating population expansion. The mutation rate of Cytochrome *b*, calibrated with pairs of species of *Cynoscion* found on both sides of the Isthmus of Panama was estimated at 0.006 substitutions per million years. The Bayesian skyline plot was used to date changes in population size through time and revealed a coalescence time of 155,000 years. *Cynoscion guatucupa* exhibited a mutation accumulation pattern associated with a rapid population growth after a period of low effective population size, probably linked to climatic changes in the late Pleistocene.

Key words: genetic structure, cytochrome *b*, marine fish, Pleistocene, mutation rate

RESUMEN

Durante el Pleistoceno se registraron en Sudamérica importantes cambios climáticos relacionados con ciclos de glaciaciones que probablemente han tenido efectos significativos en la historia evolutiva de muchas especies marinas. Para evaluar el patrón de demografía histórica y la estructura genético poblacional de la pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) se analizó una secuencia de 401 pb del Citocromo *b* del ADN mitocondrial de 92 individuos de tres áreas costeras en Argentina y una de Brasil en el Atlántico sudoccidental. La diversidad haplotípica fue alta y la diversidad nucleotídica fue baja para todos los sitios de muestreo. La topología en forma de estrella en base a los haplotipos mitocondriales muestra un patrón no estructurado geográficamente en concordancia con el análisis de AMOVA. El test de Fu fue negativo y altamente significativo, mientras que el análisis de *mismatch distribution* produjo una distribución unimodal, indicando expansión poblacional. La tasa de mutación del Citocromo *b*, calibrada a partir de la comparación de la divergencia entre especies del género *Cynoscion* encontrados en ambos lados del Istmo de Panamá fue estimada en 0,006 sustituciones por millón de años. Para datar el cambio del tamaño poblacional a través del tiempo se usó *Bayesian Skyline Plot* estimando un tiempo a la coalescencia de 155.000 años. *Cynoscion guatucupa* mostró un patrón de acumulación de mutaciones asociado a un rápido crecimiento poblacional luego de un cuello de botella, probablemente relacionado con un evento de cambio climático ocurrido en el Pleistoceno medio-tardío.

Palabras clave: estructura genética, citocromo *b*, peces marinos, Pleistoceno, tasa de mutación

Fecha de recepción: 22/12/2014
Fecha de aceptación de versión final: 27/04/2015

INTRODUCTION

Marine fish characterized by high dispersal usually display a weak phylogeographic structure (Avise, 1987); isolation by distance only occurs at large geographical scales (Matschiner *et al.*, 2010). This pattern is associated with the general absence of dispersive barriers as well as with the high level of spatial connectivity among environments (Grant and Bowen, 1998). However, the climatic changes associated with glaciations produced variations in sea temperature, current changes and/or loss of coastal habitats, which played a key role in the evolutionary history of marine species (Hewitt, 2000; Rabassa *et al.*, 2011). During the Pleistocene, 10,000 years - 2 million years ago, global glaciation cycles affected the genetic structure of terrestrial as well as of marine species (Hewitt, 2000). In South America, three major glaciations occurred in the last 250,000 years (Rabassa *et al.*, 2005; 2011). These climatic changes in the southwestern Atlantic affected the distribution patterns and abundance of marine fishes. Earlier studies using mitochondrial DNA sequences (control region and Cytochrome *b*) in South American coastal fishes account for phylogeographic patterns that are not geographically structured in *Cynoscion acoupa* (Rodrigues *et al.*, 2008), *Macrodon ancylodon* (Santos *et al.*, 2006), *Pagrus pagrus* (Porrini *et al.*, 2015) and *Eleginops maclovinus* (Ceballos *et al.*, 2012) or with a moderate or low genetic structuring in *Odontesthes argentinensis* (Beheregaray and Sunnucks, 2001), *Brevoortia aurea* (García *et al.*, 2008), *Micropogonias furnieri* (Pereira *et al.*, 2009), and *Paralichthys orbignyanus* (Fernández Iriarte *et al.*, 2014). Likewise, there is clear evidence of population expansion, in several cases, related to the climatic and geographic changes that took place in marine and coastal regions during the Pleistocene.

Striped weakfish *Cynoscion guatucupa* Cuvier 1830, is a widely spread demersal fish predominantly found on southwestern Atlantic coasts, ranging from Rio de Janeiro, Brazil (22° S), to Chubut province, Argentina (43° S). It inhabits coastal areas and part of the continental shelf, and is found in sea and estuarine waters, being typically caught in Brazil, Uruguay and Argentina (Cousseau and Perrotta, 2004). Argentine landings are from catches made from two main fishing areas: the Argentine-Uruguayan Common Fishing Zone (34° S to 39° S), and the southern area of Buenos Aires province (El Rincón, 39° S to 41° S), being the second most important species (Ruarte *et*

al., 2004). Earlier studies focusing on Argentine samples of *C. guatucupa* and using the mitochondrial Control Region postulate that there is no pattern of genetic structure among Argentinean populations, though an historical population expansion would have occurred (Sabadin *et al.*, 2009; Fernández Iriarte *et al.*, 2011).

The objectives of this study were: (i) to analyze *C. guatucupa* genetic structure using Cytochrome *b* marker across its distribution in the southwestern Atlantic, including a sample from Brazil (reaching most of the species distribution), (ii) to calibrate the mutation rate for this mitochondrial gene fragment using this data set, and (iii) to infer the main historical demographic events in the species.

MATERIALS AND METHODS

Sampling, DNA extraction, PCR amplification and sequencing
Samples of muscle tissue kept in ethanol were obtained from adult individuals caught in El Rincón (39° S; 61° W) (n= 25), Mar Chiquita (37° S; 57° W) (n= 21), and Samborombón (36° S; 56° W) (n= 28) on Buenos Aires province coast (Argentina) and in Ubatuba (23° S; 45° W) (n= 18) on the Brazilian coast (Figure 1). Specimens were obtained from local fishermen and/or from landing samplings collected from different ports. DNA was extracted using Chelex 100 method (Estoup *et al.*, 1996). A small muscle piece of each individual (100-150 mg) was incubated with 500 µl of Chelex 100 at 10 % solution and 25 µl of Proteinase K (20 µg/µl) for 1 hour at 56 °C followed by 100 °C for 15 min. The amplification of a partial fragment of Cytochrome *b* (Cyt *b*) was conducted using primers Glu-L-CP and CB2-H (Aboim *et al.*, 2005). PCR conditions using 50 µl reaction volumes were: 5 µl of 10× buffer, 3.6 µl of Cl2Mg (25 mM), 5 µl of each primer (200 mM), 6 µl of dNTPs (100 mM), 1 µl of Taq polymerase (5 U/µl), and 5 µl of genomic DNA. The reaction volume was completed with water. PCR was performed in a GeneAmp PCR system 2700 thermocycler (Applied Biosystems) at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 50 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, with a final extension of 72 °C for 5 min. The PCR product was purified and sequenced in MACROGEN Korea (<http://www.macrogen.com/>).

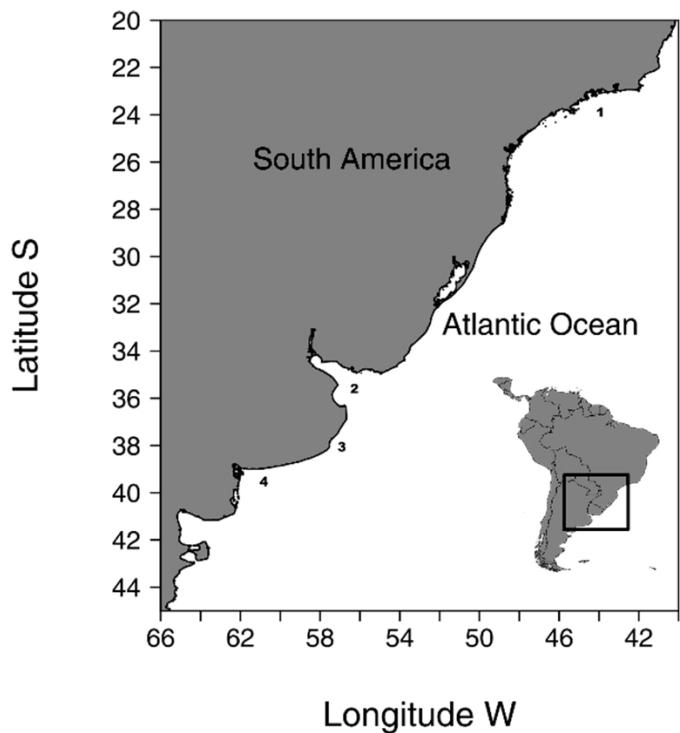


Figure 1. Study area and sampling sites of *Cynoscion guatucupa* from Southwestern Atlantic: 1, Ubatuba; 2, Samborombón; 3, Mar Chiquita; 4, El Rincón.

Population genetic analysis

Sequences were manually aligned using PROSEQ (Filatov, 2002). For each sampling site, haplotype (h) and nucleotide (π) diversity were estimated using DNAsp v5 (Librado and Rozas, 2009). Likewise, to detect historical demographic changes, the D (Tajima, 1989) and F_s (Fu, 1997) neutrality tests were calculated to discriminate mutation/drift equilibrium and to evaluate the hypothesis of population expansion through the significant excess of low-frequency haplotypes. These parameters were calculated using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Mismatch distribution was also estimated with DNAsp, and it was compared with the distribution expected under a model of sudden population expansion. Deviations from the model were evaluated by calculating the R_2 index (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). Those populations that have undergone large expansion are expected to exhibit unimodal mismatch distributions with a low R_2 value; while stable populations produce a variety of multimodal distributions with a high R_2 index. The significance of D ,

F_s and R_2 indices was evaluated on 10,000 simulations. The genetic structure of *C. guatucupa* was assessed by the Analysis of Molecular Variance (AMOVA), and pairwise genetic distances were estimated to assess fixation indices (F_{ST}) among all population pairs (10,000 permutation) in ARLEQUIN. The haplotype median-joining network was constructed using Network 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999).

Molecular clock and coalescence time

The pair of *Cynoscion* species found on both sides of the Isthmus of Panama has evolved in isolation for about 3.5 million years (Coates *et al.*, 1992), and could be used to calibrate the molecular clock (Bermingham and Lessios, 1993). Hence, by comparing the variations within and among *Cynoscion* genus species for Cyt b sequence (Vergara-Chen *et al.*, 2009), less biased estimates of the mutation rate could be calculated, and historical demographic changes occurring in the glaciations could be inferred with greater precision. Cyt b sequences were obtained from GenBank for *C. reticulatus* Günther, 1864 (GQ220005.1), *C. nothus* Holbrook, 1848 (GQ220006.1), *C. phoxocephalus* Jordan and Gilbert, 1882 (GQ220010.1) and *C. leiarhus* Cuvier, 1830 (GQ219999.1). The molecular clock was calculated from the sequences of *Cynoscion* genus using Kimura 2-parameter distance (Kimura, 1980).

Expansion time was directly estimated from mismatch distribution with the statistic τ (tau) and translated into absolute time in years (t), using the equation $t = \tau / 2\mu k$, where μ is the mutation rate per year and k is the number of nucleotides of the sequence analyzed. Confidence intervals for t estimates were obtained using a parametric bootstrap approach in ARLEQUIN. On the other hand, the substitution model of Cyt b in *C. guatucupa* was determined using jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) and, based on such model, expansion time was calculated using the Bayesian Skyline Plot (BSP) in BEAST (Drummond and Rambaut, 2007). BSP analysis was performed using a relaxed molecular clock, with three runs of 10 million steps (MCMC) each, where trees and parameters were sampled every 1,000 steps. The fact that the ESS values estimated with Tracer were > 200 (Drummond *et al.*, 2012) allowed determining that the two independent runs converged on the same distribution in the MCMC run. Only one of the three runs was plotted. To estimate coalescence time, the calibrated mutation rate was applied.

RESULTS

Molecular diversity, demography and network

A 401 bp fragment of the mitochondrial Cyt *b* gene was sequenced for 92 individuals. Thirty one different haplotypes (GenBank Accession numbers KR086363-KR086393), 27 substitutions (22 transitions and 5 transversions) were observed. The average number of nucleotide differences between pairs of sequences (*k*) was 1.504 (Table 1). The molecular diversity patterns for all individuals revealed a haplotype diversity (*h*) (mean \pm SD) = 0.822 ± 0.034 and a nucleotide diversity (π) (mean \pm SD) = 0.004 ± 0.003 (Table 1). Haplotype diversities decreased from South to North ranging from 0.903 ± 0.001 in RIN to 0.569 ± 0.018 in UBA, respectively.

The statistical test of neutrality (*D*) was negative and significant for each site except for Samborombón when all samples were analyzed together; the Fu's *F* was negative and statistically significant in all sites and at a total level (Table 1). The global mismatch analysis yielded a unimodal distribution curve (Figure 2) associated with the low *R₂* value (*R₂* = 0.026, *P* < 0.05).

The network of Cyt *b* haplotypes displayed no evidence of a phylogeographic structure and showed a star-like pattern with two highly represented central haplotypes, differentiated from each other by a single mutation step (Figure 3). AMOVA indicated that the largest genetic variation was within groups and not among them ($F_{ST} = -0.011$, *df* = 3, 88, *P* = 0.81). Additionally, no significant *f_{ST}* values (*P* > 0.05) were noticed among site pairs: UBA-SAM ($F_{ST} = -0.013$), UBA-MCH ($F_{ST} = -0.010$); UBA-RIN ($F_{ST} = -0.007$), SAM-MCH ($F_{ST} = -0.010$), SAM-RIN ($F_{ST} = -0.010$) and MCH-RIN ($F_{ST} = -0.014$).

Mutation rate, *Tau* and *BSP*

Regarding *C. reticulatus* - *C. nothus* sequences, the genetic distance was of 0.052 and for *C. phoxocephalus* - *C. leiarchus*, it was of 0.034, thereby yielding a mean genetic distance of 0.043 between species. A mutation rate of 1.2 % between species of the *Cynoscion* genus was estimated on the basis of such distance. Given the fact that the mutation rate within lineages is half the rate between lineages (Bowen *et al.*, 2006), a mutation rate of 0.6 % per million years was established.

Table 1. Genetic diversity and demographic parameter for 401 bp fragment of the mitochondrial Cyt *b* gene from *Cynoscion guatucupa* in Ubatuba (UBA), Samborombón (SAM), Mar Chiquita (MCH) and El Rincón (RIN): sample size (*n*), number of haplotypes (*N_H*), number of polymorphic sites (*N_P*), average number of nucleotide differences between pairs of sequences (*k*), haplotype diversity (*h*); nucleotide diversity (π), Tajima's *D*, Fu's *F_s* and *R₂*.

Sample	<i>n</i>	<i>N_H</i>	<i>N_P</i>	<i>k</i>	<i>h</i> (sd)	π (sd)	<i>D</i>	<i>F_s</i>	<i>R₂</i>
UBA	18	7	8	1.203	0.569 (0.018)	0.003 (0.002)	-1.678*	-3.11*	0.098*
SAM	28	11	9	1.217	0.796 (0.003)	0.003 (0.002)	-1.496	-7.57**	0.063**
MCH	21	13	13	2.029	0.886 (0.003)	0.005 (0.003)	-1.571*	-9.15**	0.065*
RIN	25	13	12	1.647	0.903 (0.001)	0.004 (0.003)	-1.637*	-9.48**	0.061**
ALL	92	31	27	1.504	0.822 (0.034)	0.004 (0.003)	-2.176**	-36.87 **	0.026*

*P < 0.05, **P < 0.001.

The t (τ) parameter, in turn, was 1.55 (confidence interval, $a = 0.050$: 1.15–1.99), estimating the expansion time at 320,000 (230,000–410,000) years ago.

The substitution rate of *Cyt b* using Akaike information criterion was adjusted to the Hasegawa, Kishino and Yano model (HKY) more the proportion of invariable sites (I). BSP, using a mutation rate of 0.006 substitutions per million years, revealed a significant reduction in population size followed by an expansion about 155,000 years ago (Figure 4).

Moreover, for BSP construction, confidence intervals for estimates of this marker in several fish species (1–1.8 %) (Pfeiler *et al.*, 2008) were used. These substitution rates of 0.009 substitutions per million years (maximum) and 0.005 substitutions per million years (minimum), yielded coalescence values ranging from 105,000 to 185,000 years, respectively (Figure 4).

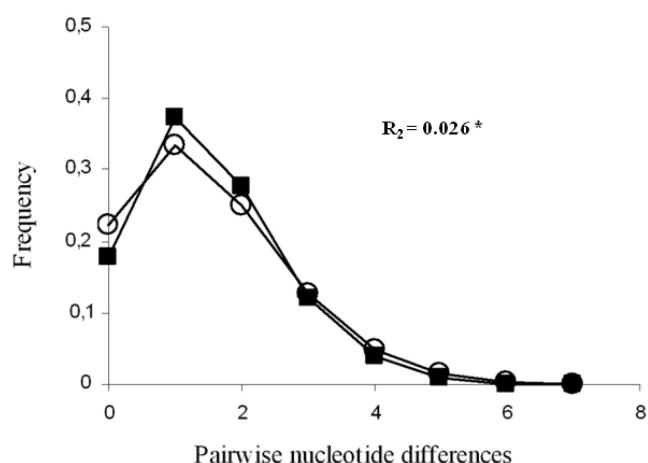


Figure 2. Mismatch distribution (observed values: closed squares; expected values: open circles). R_2 (raggedness index), * $P < 0.05$.

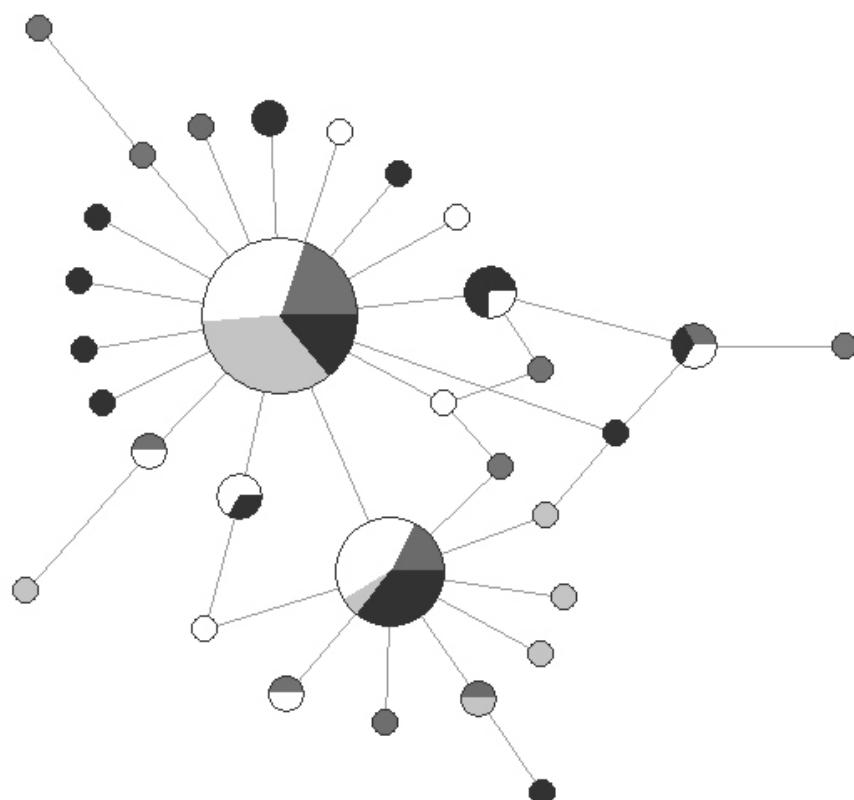


Figure 3. Mitochondrial DNA network of *Cyt b* sequences for *Cynoscion guatucupa*. Circle size is proportional to haplotype frequency in each sample site: Ubatuba (light grey), Samborombón (white), Mar Chiquita (dark grey) and El Rincón (black), respectively. Line length is proportional to the number of mutations separating the haplotypes (one or two mutations in this case).

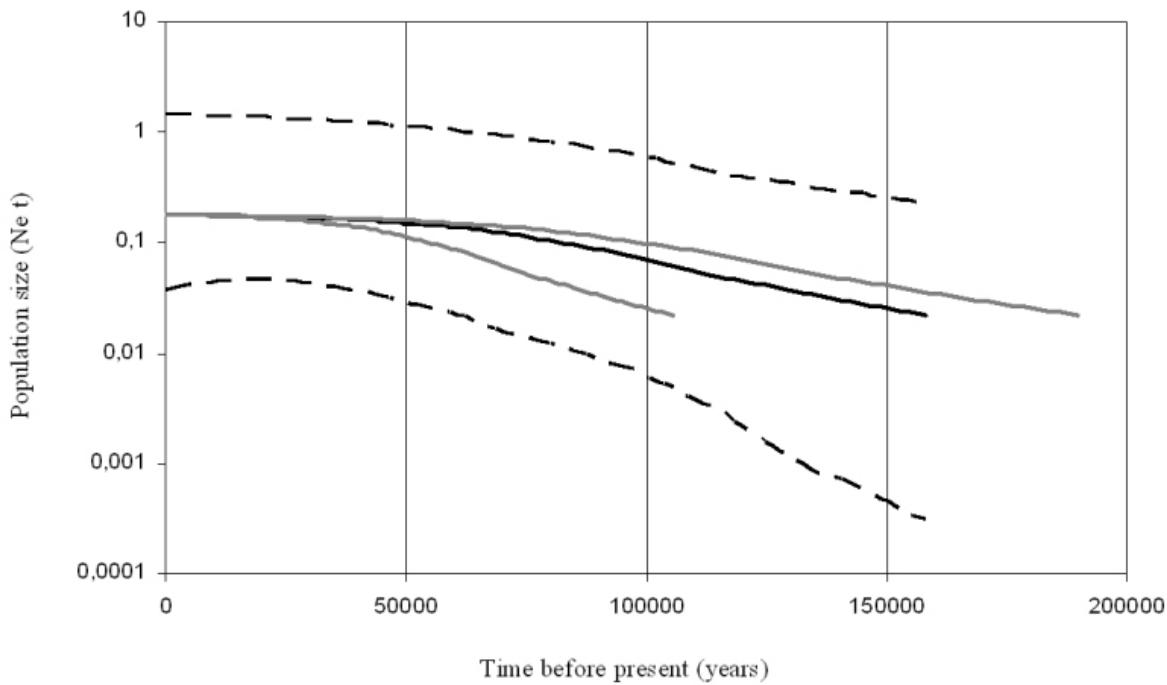


Figure 4. BSP based on mitochondrial Cyt *b* haplotypes. The y axis represents the product of the effective population size (N_e) and generation length (t) in a log scale. The black solid lines are median estimates under the assumed mutation rate of 0.006 substitutions per million years, and the dotted lines indicate 95 % highest density regions. The thin top solid line shows the median obtained under the mutation rate of 0.005, while the thin bottom line depicts the median obtained under the assumption of a mutation rate of 0.009.

DISCUSSION

The absence of a genetic structure across *C. guatucupa* distribution in the southwestern Atlantic may be explained by the fact that this species is characterized by high dispersal and weak barriers to gene flow. Population expansion, estimated by means of the substitution rate of Cyt *b*, showed demographic processes of low population size after one of the largest Pleistocene glaciations. AMOVA indicated absence of genetic differentiation among sampling sites but most genetic variation among the Cyt *b* haplotypes was distributed within sites. These results are consistent with those accounted for by Sabadin *et al.* (2009), which found no differences in two microsatellite loci in individuals from Samborombón and El Rincón. The same result was achieved in the study conducted for the mtDNA control region (Fernández Iriarte *et al.*, 2011), which reported lack of genetic structuring among

Samborombón, El Rincón and Mar Chiquita. The absence of the genetic differentiation is evident in the haplotype network, in which no genetic structure is observed and individuals from all sites share common haplotypes. This pattern is common in many marine fish species given their life history, characterized by high dispersal and absence of natural barriers (Zane *et al.*, 2006; Pfeiler *et al.*, 2008). When evaluating the individuals from the different sampling sites, no qualitative differences were observed in the molecular diversity values analyzed (h and π) taking, for both cases, a high h (> 0.5) and a low π (< 0.005) as a cut-off point (Grant and Bowen, 1998). Pi (π) values, both at a global and at each sampling site level, were similar and low, while h values were high but showed a pattern of decreasing variability from South (RIN) to North (UBA). The sample from Ubatuba represents the most northern distribution of the species with temperatures that could represent a less favorable habitat. The high haplotype

and low nucleotide diversities of *Cynoscion guatucupa* characterize species that have undergone a historical bottleneck, followed by population expansion with accumulation of mutations (Type 2; Grant and Bowen, 1998). This pattern was observed in species not genetically structured as *C. guatucupa* (Fernández Iriarte *et al.*, 2011), *Eleginops maclovinus* (Ceballos *et al.*, 2012) and *Pagrus pagrus* (Porrini *et al.*, 2015). On the contrary, it is considered that those species with low haplotype and nucleotide diversity have undergone a recent bottleneck or founder effect (Type 1, Grant and Bowen, 1998). This pattern was observed in species such as *M. furnieri* (Pereira *et al.*, 2009) and *P. orbignyanus* (Fernández Iriarte *et al.*, 2014).

The molecular diversity values are also consistent with the unimodal distribution curve and, together with the low R_2 value and the negative F_s values, could indicate that the species underwent demographic expansion. The starting period of population expansion differs depending on the method. The value calculated from t was of 320,000 years (240,000–410,000) and from BSP, of 155,000. Despite the fact that it has been suggested that T tends to underestimate coalescence time, this parameter is very sensitive to mismatch curve variations; thus, small variations could have a great effect on expansion time estimates (Schneider and Excoffier, 1999). Another point in this regard is the heterogeneity of the substitution rate along the analyzed sequence and its relevance when expansion time is calculated. In view of the fact that BSP uses the substitution model under which the sequence mutates to calculate population expansion, the value obtained would be more representative. The data obtained from BSP for Cyt b (155,000 years) is in agreement with that estimated for the mtDNA control region (190,000 years; Fernández Iriarte *et al.*, 2011). In this sense, changes in population size estimated with Cyt b associate better with the Quaternary climatic changes with a population expansion time that would correspond to the end of the most extensive glaciation event recorded in the last 250,000 years (140,000–180,000 years ago) (Ruzzante *et al.*, 2008). Recent studies using Cyt b in the Patagonian blennie fish *Eleginops maclovinus* Cuvier and Valenciennes 1830, from the southwestern Atlantic estimate a coalescence of 125,000 years (Ceballos *et al.*, 2012), also associated with the end of such cold period.

The substitution rate of Cyt b in fishes was five to ten times lower than that of the control region (Bargelloni *et al.*, 2003), while in *C. guatucupa* this value was 8.3 times

smaller. In general, the mean mutation rate of the estimated control region was 0.05 substitutions per million years (Bowen *et al.*, 2006; Ruzzante *et al.*, 2008; Fernández Iriarte *et al.*, 2011). In this sense, the mutation rate reported here, calibrated by the divergence between species, increases the reliability of the estimated times, and is consistent with that used for other fish groups, being very similar to that applied to Cyt b in *E. maclovinus* (0.0056), in line with the fossil record. Even though the real starting period of population expansion may be slightly different, present data suggests that the glacial period could have been particularly relevant for the distribution and abundance of marine species in the southwestern Atlantic.

BIBLIOGRAPHY

- Aboim M.A., Menezes G.M., Schlitt T., Rodgers A.D. (2005) Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequences analysis. Mol. Ecol. 14: 1343–1354.
- Avise J.C., Arnold J., Ball M., Bermingham E., Lamb T., Neigell J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18: 489–522.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16: 37–48.
- Bargelloni L., Alarcon J.A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Reis C., Patarnello T. (2003) Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. J. Evol. Biol. 16: 1149–1158.
- Beheregaray L.B., Sunnucks P. (2001) Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. Mol. Ecol. 10: 2849–2866.
- Bermingham E., Lessios H.A. (1993) Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 2734-2738.
- Bowen B.W., Muss A., Rocha L.A., Grant W.S. (2006) Shallow mtDNA Coalescence in Atlantic Pygmy Angelfishes (genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean. J. Hered. 97: 1-12.
- Ceballos S.G., Lessa E.P., Victorio M.F., Fernández D.A. (2012) Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion. Mar. Biol. 159: 499-505.
- Coates A., Jackson J., Collins L., Cronin T., Dowsett H., Bybell L., Jung P., Obando J. (1992) Closure of the Isthmus of Panama: the near shore marine record of Costa Rica and western Panama. Geological Soc. of Amer. Bull. 104: 814-828.
- Cousseau M.B., Perrotta R.G. (2004) Peces marinos de Argentina. Biología, distribución y pesca. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, Argentina.
- Drummond A., Rambaut A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7: 214.
- Drummond A., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 29: 1969-1973.
- Estoup A., Largiadèr C.R., Perrot E., Chourrout D. (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Mol. Mar. Biol. and Biotechnol. 5: 295-298.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) ARLEQUIN ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinformatics 1: 47-50.
- Fernández Iriarte P.J., Alonso M.P., Sabadin D.E., Arauz P.A., Iudica C.M. (2011) Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. Sci. Mar. 75: 701-706.
- Fernández Iriarte P.J., Fainburg L., Porrini L., Alonso M.P., Sabadin D. (2014) Genética, filogeografía y conservación de peces del Atlántico suroccidental. Primer Congreso Latinoamericano de Genética para la Conservación, 5-9 de Mayo 2014, Macuto, Vargas, Venezuela; p. 28.
- Filatov D.A. (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. Mol. Ecol. Notes 2: 621-624.
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925.
- García G., Vergara J., Gutiérrez V. (2008) Phylogeography of the Southwestern Atlantic menhaden genus *Brevoortia* (Clupeidae, Alosinae). Mar. Biol. 155: 325-336.
- Grant W.S., Bowen B.W. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered. 89: 415-426.
- Hewitt G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907-913.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- Librado P., Rozas J. (2009) DNAsp v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Matschiner M., Hanel R., Salzburger W. (2010) Phylogeography and speciation processes in marine fishes and fishes from large freshwater lakes. In: Rutgers D.S. (Ed.) Phylogeography. Nova Science Publishers, New York, pp. 1-29.
- Pereira A.N., Marquez A., Marin M., Marin Y. (2009) Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Rio de la Plata and oceanic front in Uruguay. J. Fish Biol. 75: 321-331.
- Pfeiler E., Watts T., Pugh J., van der Heiden A.M. (2008) Speciation and demographic history of the Cortez

- bonefish, *Albula* sp. A (Albuliformes: Albulidae), in the Gulf of California inferred from mitochondrial DNA. J. Fish Biol. 73: 382-394.
- Porrini L., Fernández Iriarte P.J., Iudica C., Aristizabal Abud E. (2015) Population genetic structure and body shape assessment of *Pagrus pagrus* (Perciformes: Sparidae) from Buenos Aires coast of the Argentine Sea. Neotrop. Ichth. In press.
- Posada D. (2008) JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25: 1253-1256.
- Rabassa J., Coronato A.M., Salemme M. (2005) Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). J. South Am. Earth Sci. 20: 81-103.
- Rabassa J., Coronato A.M., Martínez O. (2011) Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. Biol. J. Linn. Soc. 103: 316-335.
- Ramos-Onsins S.E., Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Mol. Biol. Evol. 19: 2092-2100.
- Rodrigues R., Schneider H., Santos S., Vallinoto M., Sain-Paul U., Sampaio I. (2008) Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. Gen. Mol. Biol. 31: 487-492.
- Ruarte C., Lasta C., Carozza C. (2004) Pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*). In: Boschi E. (Ed.) El Mar Argentino y sus recursos pesqueros, vol. 4, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, Argentina, pp. 271-281.
- Ruzzante D.E., Walde S.J., Gosse J.C., Cussac V.E., Habit E., Zemlak T.S., Adams E.D.M. (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. Mol. Ecol. 17: 2234-2244.
- Sabadin D.E., González Castro M., Iudica C., Díaz de Astarloa J.M., Fernández Iriarte P.J. (2009) Morphometric and genetic assessment of the *Cynoscion guatucupa* population structure from Buenos Aires coast, Argentine Sea. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 45: 513-517.
- Santos S., Hrbek T., Farias I.P., Schneider H., Sampaio I. (2006) Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. Mol. Ecol. 15: 4361-4373.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. Genetics 152 (3): 1079-1089.
- Tajima F. (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics 123: 597-601.
- Vergara-Chen C., Aguirre W.E., González-Wangüemert M., Bermingham E. (2009) A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the *Cynoscion* group (Pisces: Sciaenidae). Mol. Phylogenet. Evol. 53: 602-607.
- Zane L., Marcato S., Bargelloni L., Bortolotto E., Papetti C., Simonato M., Varotto V., Patarnello T. (2006) Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. Mol. Ecol. 15: 4499-4511.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank two anonymous reviewers who improved the previous versions of this manuscript. This work was financially supported by “Universidad Nacional de Mar del Plata” under grants 15/E534 and 15/E627 and “Comisión Nacional de Investigaciones Científicas” under grant PIP 2504 and 0798.

GENEALOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF AN ARGENTINEAN ANGUS SEEDSTOCK HERD

ANÁLISIS GENEALÓGICO Y MOLECULAR DE UN PLANTEL ANGUS DE ARGENTINA

Corva P.M.^{1*}, Colavita M.I.¹, Legaz G.², Martínez M.²

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Unidad Integrada Balcarce.
C.C. 276, 7620 Balcarce, Argentina

² Laboratorio de Genética Aplicada, Sociedad Rural Argentina. Juncal 4431, 2º Piso, 1425 Buenos Aires, Argentina.

* Author for correspondence
corva.pablo@inta.gob.ar

ABSTRACT

Introduced in Argentina from the British Isles in 1879, the Angus progressively became the most popular beef cattle breed in the country. In this article the analysis of genealogical and molecular information generated in the registration process of progenies from an Angus seedstock herd is presented. The objectives were to analyze the genetic structure of the herd, and to use the acquired information to get insight of the history of the Angus breed in Argentina. Pedigree information from 16,611 individuals born between 1954 and 2012 was analyzed, including Black and Red Angus. Also available were genotypes of 17 microsatellites from 470 individuals born between 2005 and 2012. Identification of the most influential ancestors showed a trend that is consistent with the evolution of selection objectives, mostly associated with changes in body size. Generation intervals in the male pathways also reflected drastic changes in selection objectives over time. Molecular kinship and genealogical average relatedness have been steadily increasing. Molecular F_{IS} was -0.023, indicating that matings were planned in order to avoid inbreeding, which increased 0.70% per Equivalent Generation. Genetic distance showed that Black and Red Angus are two separated lines within this herd. Molecular and genealogical information jointly allowed for a reliable characterization of the genetic structure of the herd, a strategy that should be extended to the entire breed to monitor genetic variability and to help in breeding decisions.

Key words: population structure, coancestry, microsatellites, inbreeding

RESUMEN

La raza Angus fue introducida en Argentina desde las Islas Británicas en 1879 y progresivamente se convirtió en la principal raza para carne del país. En este trabajo se analiza información genealógica y molecular generada en el proceso de inscripción de reproductores de un plantel Angus Puro de Pedigree, con dos objetivos: analizar la estructura genética del plantel y en función de la misma, revelar aspectos relevantes de la historia de la raza en el país. Se utilizaron registros genealógicos de 16.611 animales (Negros y Colorados) nacidos entre 1954 y 2012 y los genotipos de 17 microsatélites en 470 animales nacidos entre 2005 y 2012. La identificación de ancestros más influyentes y la estimación de intervalos generacionales mostraron una tendencia consistente con la evolución de los objetivos de selección asociados a cambios en el tamaño a través del tiempo. La coancestría molecular y el parentesco están aumentando en forma sostenida, pero el incremento en consanguinidad fue sólo 0.70% por generación equivalente. El F_{IS} molecular igual a -0.023 indica que los apareamientos se planean para minimizar la consanguinidad. Las distancias genéticas entre Angus Negro y Colorado muestran que ambos se manejan como líneas separadas. La utilización de información genealógica y molecular permitió la caracterización de la estructura genética del plantel, y esta estrategia debería extenderse a toda la raza para monitorear el incremento de la consanguinidad y la pérdida de variabilidad y ayudar en las decisiones de selección.

Palabras clave: estructura poblacional, coancestría, microsatélites, consanguinidad

Fecha de recepción: 11/05/2015
Fecha de aceptación de versión final: 18/08/2015

INTRODUCTION

Introduced in Argentina from the British Isles in 1879, the Angus breed was very successful and progressively became the most popular beef cattle breed in the country. Currently, approximately 50% of the stock corresponds to pure-blood Angus and another 20% to crosses (Argentinean Angus Association, 2014). In this process, Angus breeders had to adapt to several changes in selection objectives, to the point of having to reverse the path taken, as it was the case of the selection for higher growth rate and body size that dominated selection objectives in the 1970s-1980s and which led to the production of extremely large animals that performed poorly in extensive production systems (Molinuevo, 2005). Since then, breeders have been successfully working on the definition of a local biotype, adapted to the prevailing production systems and markets.

The process of registration of all cattle breeds in the Argentinean Herd Book requires paternity confirmation (Sociedad Rural Argentina, 2014). Parentage verification was originally based on blood groups analysis, but this system was replaced by the use of molecular markers in 2005. Since then, more than 135.000 animals of different breeds have been genotyped and these procedures have contributed to the creation of an extensive database of genomic information that it is not used for other than administrative purposes. Conversely, genealogical information generated by the registration process is more valued by breeders because it is a key resource for genetic evaluation programs (estimation of Breeding Values). However, other applications of this information are still underappreciated (for example, monitoring trends in inbreeding and genetic variability).

The purpose of this work was therefore twofold: to analyze the genetic structure of a traditional Angus seedstock herd, taking advantage of two sources of information (genealogical and molecular) that are available with no additional costs but which are currently not fully appreciated, and secondly to use these results to obtain insight of the history of the Angus breed in Argentina.

MATERIAL AND METHODS

Genealogical information

The pedigree information from the Angus Herd Book was provided by the Argentinean Rural Society ("Sociedad

Rural Argentina", SRA) with consent of the herd owner. Unlike other countries, in Argentina the Angus Association considers the Black and Red Angus as two varieties of a single breed, and both were included in the files. Information was checked for consistency with the program Pedigree Viewer (Kinghorn and Kinghorn, 2014). Inconsistent information corresponding to sex, birth dates, or paternity were confirmed at the SRA web browser (<http://www.sra.org.ar/rrgg/>) and manually edited. Animals with pending registration but with genotype information (see below) were manually added to the pedigree files. The final pedigree included 16,611 animals born between 1954 and 2012.

Genealogical analyses

For each individual, the number of fully traced generations (those with 2^g ancestors known, where g is the number of generations back), the maximum number of generations traced (from the individual to the furthest ancestor) and the equivalent complete generations (computed as the sum of $\frac{1}{2}^n$ over all known ancestors, where n is the number of generations separating the individual and the known ancestor) were computed.

Genealogical information was analyzed to obtain the full coancestry matrix (Malècot, 1948), the individual coefficient of inbreeding (F) (Wright, 1969) and the average relatedness coefficient (AR) (Goyache *et al.*, 2003). The AR was defined as the probability that an allele randomly chosen from the whole population belonged to a given animal. The AR of an individual can be computed as the average of the coefficients in the row corresponding to the individual in the numerator relationship matrix (Gutierrez *et al.*, 2003). The AR is twice the average genealogical coancestry. The coefficient of coancestry (f_{ij}) between individuals i and j is defined as the probability that at a neutral, autosomal locus an allele drawn randomly from individual i is identical by descent (IBD) to an allele drawn randomly from individual j . The inbreeding coefficient of an individual i (F_i), is defined as the probability that the two alleles carried by this individual at a given locus are IBD. Effective population size and increase in inbreeding (ΔF) were estimated by computing the regression of the individual inbreeding coefficient over the number of equivalent generations, where the regression coefficient b is the increase in inbreeding between two generations and $N_e = 1/2b$ (Gutierrez and Goyache, 2005). The genetic contribution of ancestors to the herd was estimated according to Boichard *et al.* (1997).

Generation intervals were defined as the average age of parents at the birth of their progeny kept for reproduction. They were calculated for the four pathways of selection: sires to produce sires (SS), dams to produce sires (DS), sires to produce dams (SD) and dams to produce dams (DD) (Marquez and Garrick, 2007). All the pedigree analyses were conducted using the Endog v4.8 program (Gutierrez and Goyache, 2005).

Molecular analyses

The Laboratory of Applied Genetics of SRA provided all the genotypes corresponding to animals from the herd that were available by the end of 2012, alongside of an independent sample of 200 Angus individuals to be used as a reference of the breed. Total DNA was isolated from tail hair and semen samples following standard procedures. A set of 12 STR markers from the International Society of Animal Genetics (ISAG) core panel and 5 additional microsatellites were analyzed: BM2113, BM1824, INRA23, BM1818, TGLA227, TGLA126, ETH225, CYP21, SPS115, TGLA122, ETH10, BRR, ETH3, TGLA53, BMS510, BL1043 and RME40. The PCR fragments were separated by electrophoresis in a 3730 XL ABI Sequencer (Applied Biosystems). Alleles size were scored against GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems) using the Data Collection v3.0 software (Applied Biosystems).

Pedigree information and birth dates were checked and a file with the molecular information of 470 animals born between 2005 and 2012 was created. Because this group had both genealogical and molecular information, it was used as a reference population when needed.

Basic descriptive parameters of population genetics: Number of alleles per marker (Na), effective number of alleles (Ne), observed (Ho) and expected heterozygosity (He), significance of Hardy Weinberg Equilibrium departures (HWE), polymorphic informative content (PIC) and Fixation index (F) were estimated with the Genalex 6.5 software (Peakall and Smouse, 2006). The PIC refers to the value of a marker for detecting polymorphism within a population (Botstein *et al.*, 1980). It was computed as

$$\text{PIC} = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

where p_i and p_j are the frequency of alleles i and j of a given locus.

Observed heterozygosity was estimated as $Ho = (\text{No. of Heterozygotes})/N$ and expected heterozygosity was

estimated as $He = 1 - \sum p_i^2$ where p_i is the frequency of the i^{th} allele for the population and $\sum p_i^2$ is the sum of the squared population allele frequencies.

The Fixation index, which is equivalent to F_{IS} of Wright (1969), was computed as $F = 1 - (Ho / He)$.

Other analyses corresponding to molecular information were conducted using the Molkin v3.0 program (Gutierrez *et al.*, 2005). The molecular coancestry matrix among genotyped individuals was computed. The molecular coancestry (or kinship), f_{Mij} between individuals i and j at a given locus is the probability that two alleles at the locus taken at random from each individual are equal (identical by state, IBS): $f_{Mij, L} = \frac{1}{4} [I_{11} + I_{12} + I_{21} + I_{22}]$. I_{xy} is 1 when allele x on locus L in individual i and allele y in the same locus in individual j are equal, and zero otherwise. Molecular coancestry between two individuals was obtained by averaging $f_{Mij, L}$ over L analyzed loci. Molecular mean kinship (Mk) was computed as the average molecular coancestry of each individual with the rest of the population.

The molecular coancestry of an individual i with itself is the self coancestry (s_i) which is related to the coefficient of inbreeding of the individual (F_i) by the expression $F_i = (2 s_i) - 1$ (Toro *et al.*, 2011).

For individual pairwise comparisons the proportion of shared alleles was estimated as $P_{SAij} = \sum_u S / 2u$, where the number of shared alleles S is summed over all loci u . Distance between individuals i and j was estimated by $D_{SAij} = 1 - P_{SAij}$ (Chakraborty y Jin, 1993). Based on the D_{SA} matrix, an unrooted Neighbor Joining tree was constructed using the program Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

RESULTS

The genealogy of the whole population (16,611 records) spanned 14 maximum generations. There were 283 sires and 4,596 dams, with maximum paternal and maternal family sizes of 1,673 and 39 individuals, respectively. Because we got access only to the records corresponding to the herd under study some information was missing, especially that corresponding to sires that were not bred within the herd. These result affected the completeness of pedigree information, as it can be seen in Figure 1.

Generation intervals and most influential ancestors

The estimated generation intervals (Table 1) were within

the range of values recorded for other cattle populations (Gutierrez *et al.*, 2003; Marquez and Garrick, 2007; Santana Jr. *et al.*, 2012) with the exception of the Sire-Son pathway, the most relevant in terms of genetic progress, which was surprisingly long when compared to the other three pathways. It can be seen that among the most influential ancestors there are bulls from the 1960's (Table 2). Moreover, one of these comparatively older bulls, "Ankonian Big Bandoliermère 10", made the largest contribution to the genetic pool also between 2005 and 2012. This seemingly inefficient selection strategy can be understood if the changes that occurred in the selection objectives over time are taken into account, as it will be discussed later. Also related to the successive changes in selection objectives, the comparison of influential ancestors between the population as a whole and the reference group showed a trend towards a higher influence of bulls bred in local herds (Table 2). There were six local sires out of fourteen in the first case, and four out of six in the second case (bulls such as "Tres Marias 5887 Hornero-T/E-" and "Moon 16621 Ritmo").

Inbreeding

Only 86 matings between half sibs and 148 matings between parents and offspring were detected and there were only 640 individuals with $F \geq 1\%$ when the whole dataset was considered. When the analysis was restricted

to the last three generations to have a better estimation of recent inbreeding, 448 individuals with $F \geq 3\%$ were found. The average F in each case was 0.41% and 0.38%, respectively. The increase in inbreeding (F) per equivalent generation was 0.70% ($N_e = 71$).

Molecular information

Descriptive statistics of the microsatellite panel are shown in Table 3. Allele frequencies corresponding to the herd under study were compared to those of an independent sample of 200 Angus individuals, and there were no major discrepancies between the two groups (data not shown). Only six markers out of seventeen deviated from HW equilibrium. Most markers tended to have negative coefficients of fixation, which is indicative of an excess of heterozygotes. Mean molecular coancestry and molecular F_{IS} were 0.33 and -0.023, respectively. Inbreeding estimated from marker information (Identity by State, IBS) was 0.29.

Figure 2 shows that both average molecular coancestry and AR (twice average genealogical coancestry) significantly increased with respect to equivalent generations ($y = 0.27 + 0.015 x$; $R^2 = 0.11$ and $y = -0.004 + 0.001 x$; $R^2 = 0.21$ respectively).

The estimation of genetic distances based on markers (Figure 3) showed that almost all Red Angus individuals in the herd were grouped together, indicating that Red and Black Angus are most likely conducted as two separated lines in this herd.

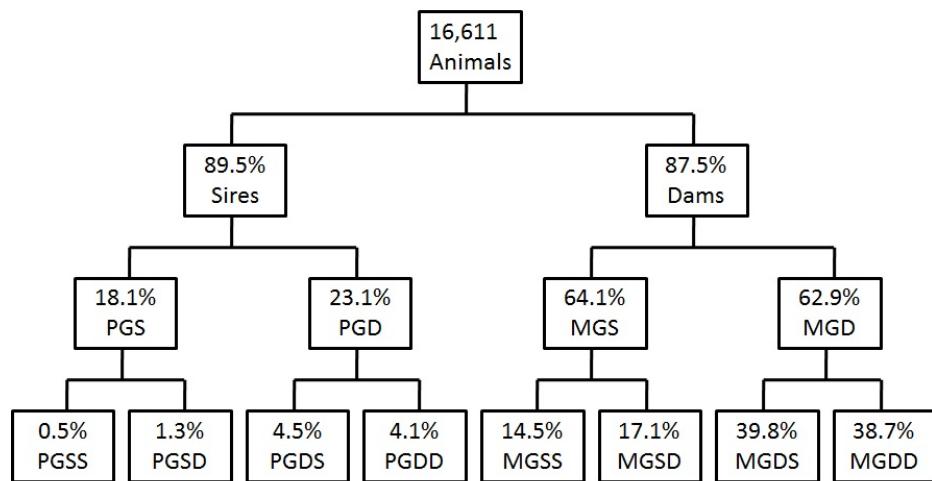


Figure 1. Completeness of pedigree information going back three generations in the analyzed Argentinean Angus seedstock herd. PGS = paternal grandsires; PGD = paternal granddams; MGS = maternal grandsires; MGD = maternal granddams; PGSS = sires of paternal grandsires; PGSD = dams of paternal grandsires; PGDS = sires of paternal granddams; PGDD = dams of paternal granddams; MGSS = sires of maternal grandsires; MGSD = dams of maternal grandsires; MGDS = sires of maternal granddams; MGDD = dams of maternal granddams.

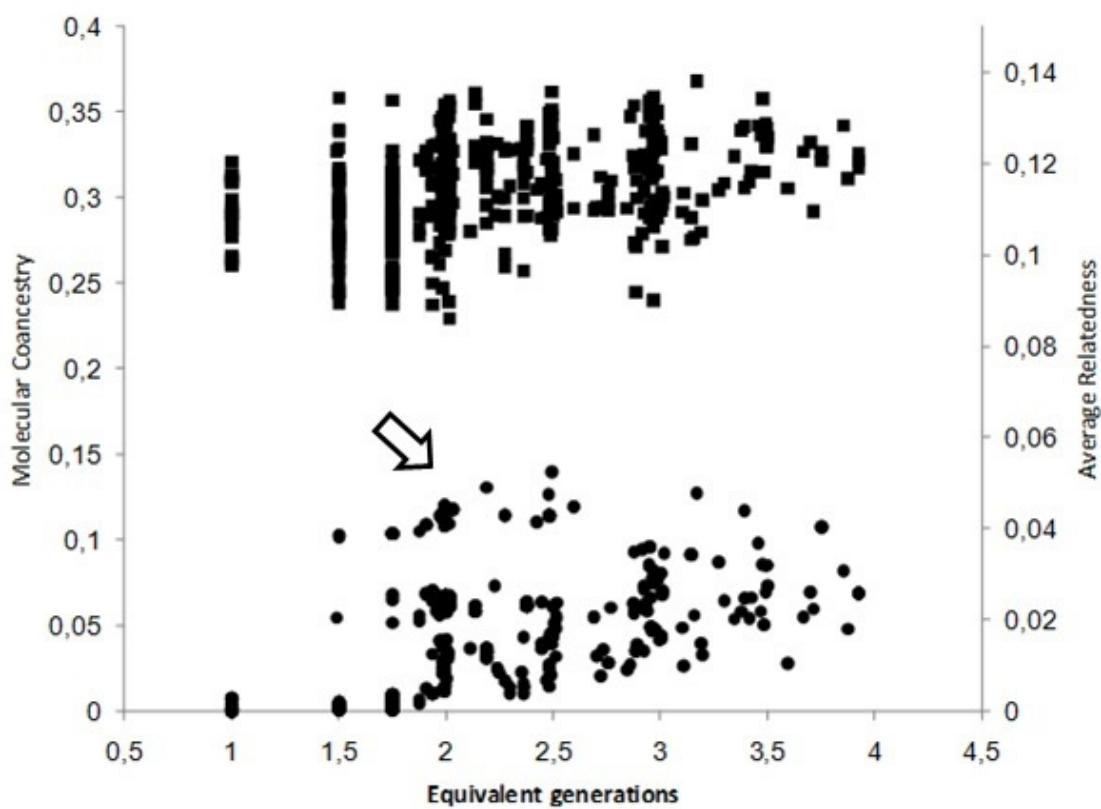


Figure 2. Changes in Average Relatedness (circles) and Molecular Mean Kinship (squares) as a function of the number of equivalent generations of 470 genotyped animals from an Argentinean Angus seedstock herd. The arrow indicates a group of 48 animals with comparatively higher AR, all sired by Ankonian Big Bandoliermere 10 (born in 1969).

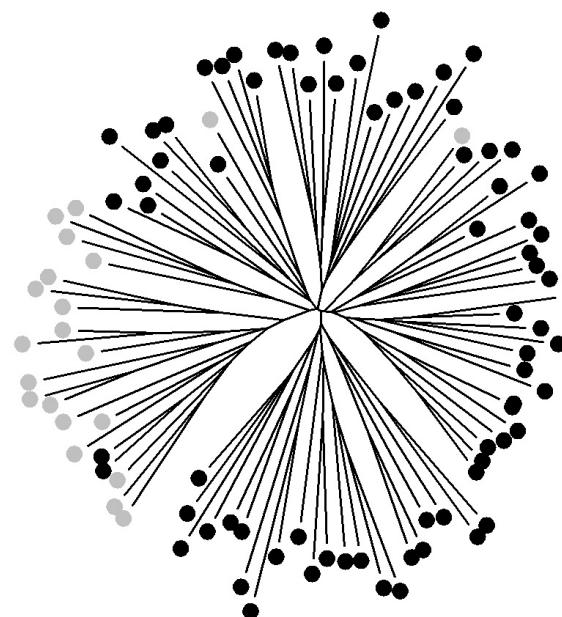


Figure 3. Unrooted neighbor-joining tree showing genetic distances based on $(1 - \text{Proportion of Shared Alleles})$ of progenies from an Argentinean Angus seedstock herd that were genotyped with a panel of 17 microsatellites. Only two progenies of each of 55 sires are shown. Black circles: Black Angus. Grey circles: Red Angus.

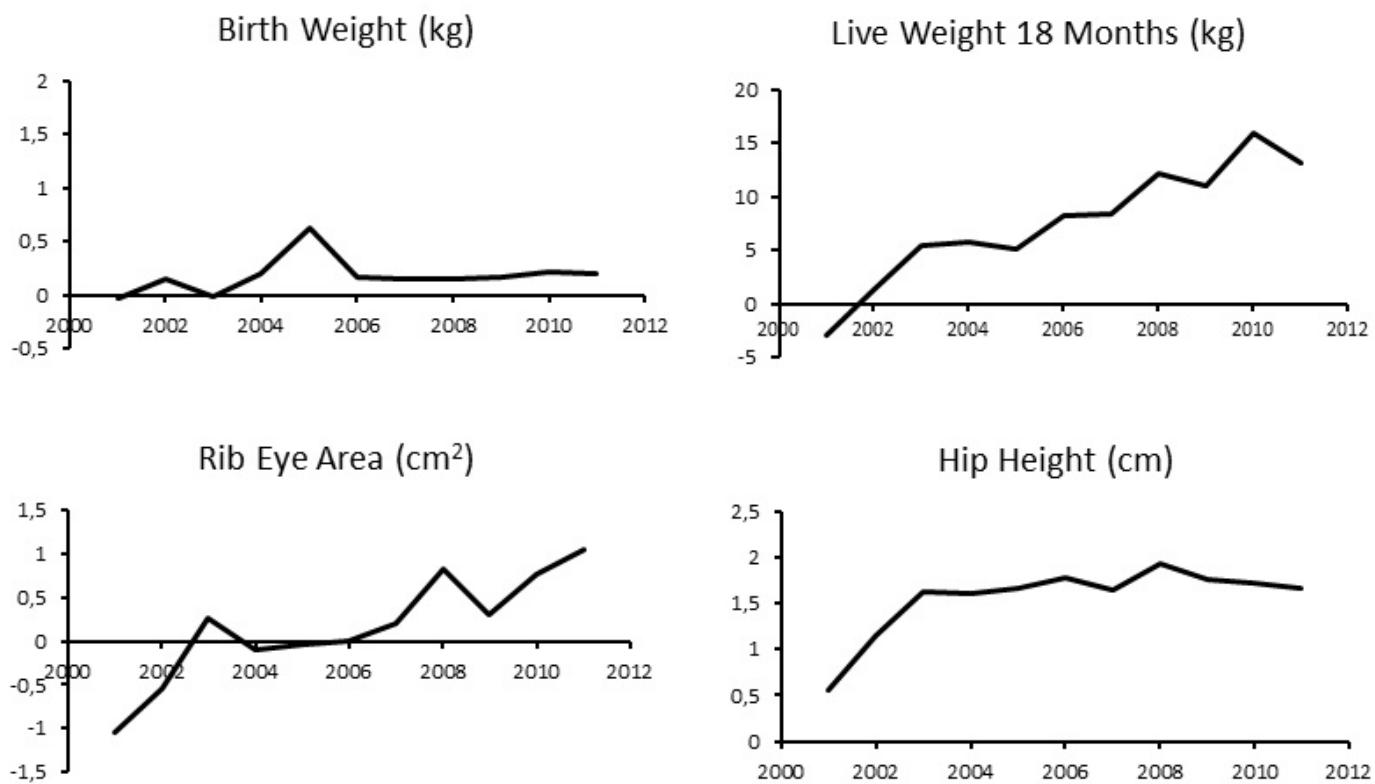


Figure 4. Genetic trends of Birth Weight, Live Weight at 18 Months of Age, Rib Eye Area and Hip Height in the Argentinean Angus seedstock herd under study (Adapted from the Angus Genetic Evaluation Program, Argentinean Angus Association, <http://www.angus.org.ar/>)

Table 1. Generation intervals computed in four pathways of selection in an Argentinean Angus seedstock herd.

Pathway ¹	n	Interval (years)	SD
SS	48	13.1	12.5
SD	3,317	6.4	4.9
DS	48	5.6	3.3
DD	3,257	6.1	3.0
Total	6,670	6.3	4.2

¹SS = sires to produce sires; DS = dams to produce sires; SD = sires to produce dams; DD = dams to produce dams.

Table 2. Ancestors explaining 50% of the genetic variability in the whole dataset and in the group of genotyped animals of the analyzed Argentinean Angus seedstock herd.

Name	Origin ¹	Year of Birth	Sex	Marginal Contribution	Comments ²
<i>Whole Pedigree</i>					
Moon 4960 Bandolierpini	ARG	1960	M	10.0	
Moon 5825 Topequity	ARG	1962	M	4.3	GCM 1966, S-GCM 1969
Freestate of Wye	USA	1966	M	3.0	SGCF 1974
Blacklock Mc Henry 13 Y	USA	1967	M	3.0	S-GCM 1974/1975, S-GCM 1977/78
Ankonian Big Bandoliermere 10	USA	1969	M	8.8	
Ankonian Gay Jingo 10719	USA	1969	M	1.3	
Ankonian Colossal 6360	USA	1970	M	1.3	
M S U Freestate 343	USA	1973	M	4.6	
Moon Reposa Trojan	ARG	1974	M	1.3	
Verbena 2440 Greatnorterndynamo	ARG	1975	M	2.6	GCM 1977/78, S-GCF 1979
Sayre Patriot	USA	1976	M	3.8	
PS Power Play	USA	1977	M	3.6	S-GCM 1984/1985, S-GCF 1982/1983, S-GCF 1984.
Moon 13893 Greatnorskyhigh	ARG	1979	M	1.6	
Primavera Gran Milagro 6970-T/E-	ARG	1986	M	2.0	GCM 1987, S-GCF 1990, S-GCM 1992, S-GCF 1992
<i>Genotyped animals (born 2005-2012)</i>					
Ankonian Big Bandoliermere 10	USA	1969	M	17.3	
Primavera Gran Nahuel 7894-T/E -	ARG	1991	M	4.0	S-GCF 1996
O C C Headliner 661H	USA	1998	M	5.3	Bull with two registered clones in Argentina
Tres Marias 5887 Hornero-T/E-	ARG	1999	M	7.2	S-GCM 2004, S-GCF 2007
Moon 16621 Ritmo	ARG	1999	M	7.0	
Cura 4925 Classic Headliner-T/E -	ARG	2005	M	6.4	Son of O C C Headliner 661H

¹ ARG: Argentina; USA: United States

² Results of the Palermo National Livestock Show ("Exposición Rural de Palermo", Buenos Aires, Argentina); GCM: Grand Champion Male; S-GCM: Sire of the Grand Champion Male; S-GCF: Sire of the Grand Champion Female (Firpo Brenta, 2012)

Table 3. Number of genotyped animals (n), number of alleles per marker (Na), effective number of alleles (Ne), observed (Ho) and expected heterozygosity (He), significance of Hardy Weinberg Equilibrium departures (HWE), polymorphic informative content (PIC) and coefficient of fixation (F) for the microsatellite panel used in Argentina for parentage verification in cattle.

Marker	n	Na	Ne	Ho	He	HWE ¹	PIC	F
BM2113	470	7	5.3	0.837	0.809		0.79	-0.049
BM1824	470	5	3.0	0.695	0.665		0.60	-0.060
INRA23	470	5	3.4	0.702	0.710		0.67	-0.002
BM1818	469	6	3.2	0.704	0.684		0.63	-0.022
TGLA227	470	7	5.0	0.786	0.801	*	0.77	0.019
TGLA126	470	5	3.1	0.707	0.680		0.62	-0.047
ETH225	470	5	3.8	0.716	0.738	***	0.69	0.035
CYP21	462	15	6.0	0.843	0.835	*	0.82	-0.016
SPS115	470	4	2.1	0.573	0.525	*	0.49	-0.089
TGLA122	470	5	1.7	0.410	0.405		0.38	-0.049
ETH10	470	5	2.8	0.700	0.638	***	0.57	-0.113
BRR	468	7	3.0	0.654	0.667		0.61	0.004
ETH3	334	5	2.8	0.622	0.632		0.60	0.009
TGLA53	316	9	4.2	0.779	0.763		0.72	-0.031
BMS510	322	7	4.0	0.777	0.754		0.71	-0.015
BL1043	338	9	2.6	0.649	0.613		0.59	-0.077
RME40	338	9	1.5	0.318	0.324	*	0.32	0.012

* p<0.01; *** p<0.001

DISCUSSION

The main reason to choose the herd that is described in this paper was its long tradition in breeding Angus cattle and its influence in the evolution of the breed in its early stages in the country.

In many breeds, the hierarchical structure of the population and the attempts to avoid inbreeding make many males to be usually bred in herds other than where they were used as parents (Marquez and Garrick, 2007). Most breeders do not produce bulls to breed bulls (SS) in their own herds, and always new genetic lines are evaluated together with the ones already in use. For many years, successive changes in breeding goals were associated with the use of foreign SS (first from the British Isles, then from the U.S.A.) in Argentina. Yet currently there is a higher influence of local genetic lines (Firpo Brenta, 2003). On the contrary, most breeders keep their own replacement females. Due to regulations of the SRA, we only got access to information from this particular herd with previous consent of the owner. That is why there is much more information on the side of the pedigree corresponding to dams, which were mostly bred within the herd (Figure 1) and not because the missing males and females were unknown.

Consideration of the most influential male ancestors in the herd (Table 2) provides a good description of the history of the breed, which in turn reflects the same process in other countries (U.S.A., Canada) (Ritchie, 2002). The original Angus introduced in America was represented by small-framed, early maturing animals ("Old type Angus"). By the late 1960's, selection of the Angus breed in the U.S.A. moved towards the search of leaner, more efficient, larger-framed cattle, following changes in life style and industry needs (Ritchie, 2002). This process had strong influence on selection trends in Argentina since the mid-1970's (Firpo Brenta, 2003). Since then, growth rate and body size prevailed in the selection objective of most breeders, with strong influence of imported germplasm. For example, sons and grandsons of the sire "Blacklock Mc Henry 13 Y" (born 1967) (Table 2) were closely linked to this process in its early stages; one of the sons of "Blacklock Mc Henry 13 Y", "Verbena 2440 Greatnorterndynamo" was himself an influential sire of the herd. The bull "Primavera Gran Milagro 6970-T/E" (born 1986) (Table 2) that also belongs to that stage in the history of the breed, still appeared in the local Angus Sire Summary in 2010. His

EPDs (Expected Progeny Differences) placed him among the top 5%, 2% and 20% of all evaluated sires for Birth Weight, Weaning Weight and Final Weight (18 months), respectively, confirming that he was among the largest and fastest-growing bulls in the local population.

Some of the most influential ancestors in this herd have been widely used across the breed, and themselves and/or their progeny excelled in the internationally renowned "Exposición Rural de Palermo", the most important livestock show of the country, showing the connection between the herd and the local genetic pool at large (Table 2; Firpo Brenta, 2012). Despite the importance given to objective measurements and genetic evaluation as tools for selection, show ring results strongly influence breeding decisions.

The selection towards larger-framed cattle following the trend of other countries got severe criticism, because it underestimated strong genetics x environment interactions (Molinuevo, 2005). Extreme animals did not adapt well to local production systems; especially those based on direct grazing due to their higher nutritional requirements, and also required higher slaughter weights that did not fit the local market. Under these conditions, the genetic flux among tiers in the population was virtually disrupted. Therefore, selection objectives needed to be reformulated again. The change in selection objectives along time also provides an explanation for apparently odd results about generation intervals (Table 1). The longest generation intervals correspond to the most important selection pathway (sire-son). This is because bulls born in the 1960's matched selection criteria in recent years and the availability of frozen semen allowed the intensive use of them, even in present time. In fact, these bulls were among the most influential ancestors of the herd (Table 2). "Ankonian Big Bandoliermere 10" still appeared in the local Angus Sire Summary 2014. This bull was placed among the top 75%, 90% and, 95% of all evaluated sires for Birth Weight, Weaning Weight and Final Weight (18 months), respectively.

During the transition from the Old type to the New type Angus in Argentina, the Frame Score (FS) developed at the University of Missouri (BIF, 1996) was one of the traits with most influence on the breeding goals. For the sake of comparison, the FS of representative Old Type Angus, New Type Angus and current Angus males from local seedstock herds would be around 2, 9 and 6, respectively (Argentinean Angus Association, 2014); the

corresponding hip heights for such FS at 18 months of age are 118 cm, 153 cm and 138 cm, respectively. These figures are proof of the dramatic changes along time of what was considered to be the most adequate cattle type.

Although the use of comparatively older sires cannot be considered a generalized strategy, genetic trends in this herd match those of the whole breed (Argentinean Angus Association, 2014). Emphasis is now placed on growth rate and muscling, trying to keep birth weight and adult cow size unchanged at the same time (Figure 4). These selection criteria are consistent with the search since the mid-1990's of what was considered "a local biotype", which is somewhere in between the "Old type" and "New type" Angus. The bull "Tres Marias 5887 Hornero-T/E-" (Table 2) which belongs to a highly influential genetic line in present time, is a good example of that new biotype.

Avoiding inbreeding has always been a major concern in populations under selection, because it is associated with the conservation of genetic variability and the prevention of inbreeding depression. According to Figure 2, AR and molecular coancestry are steadily increasing in the herd, demanding close attention to mating design to avoid inbreeding. The increase in molecular coancestry implies a certain degree of genetic erosion (decreasing "effective number of alleles"; Caballero and Toro, 2002). In an ideal situation of random mating without population subdivision, the AR equals one half of F in the next generation. However, the negative F_{IS} estimated in this case implies that the average F does not exceed the between individual coancestry (Royo *et al.*, 2007), confirming that matings were properly managed in what relates to inbreeding avoidance (resulting in an increase of 0.70% per equivalent generation).

The clear distinction between Black and Red Angus in the analyses of genetic distance was proof of the usefulness of marker information if genealogical information were scarce: a relatively small set of markers has the power to discriminate genetic lines within a breed (Figure 3). While some local breeders pay little attention to coat color of progenies out of black or red cows, some others keep them as separate lines, as it seems to be the case in this herd. The genetic distance between both varieties is especially noticed when genetic material is imported from countries like the U.S.A. for example, where Black and Red Angus are two separated breeds with marked differences in breeding goals.

Two assumptions of the analysis of relatedness

based on pedigrees are that all founders are unrelated and not inbred. Even if those assumptions were met, recombination during meiosis still makes IBD probabilities an imprecise estimation of genome sharing: human half-sibs, for example are expected to share half of each parental chromosome, but the actual amount shared ranges from 37% to 63% (Speed and Balding, 2015) and the individual deviation of realized IBD becomes relatively larger for more distant pedigree relationships. Moreover, in the present case inbreeding could have been underestimated to some extent due to pedigree completeness (Figure 1). For these reasons, the estimation of genome sharing directly from molecular marker information is considered a much more reliable option. High-density SNP panels are now available and the analysis of runs of homozygosity (ROH) based on SNP genotypes have been proposed as a good indicator of individual autozygosity and potentially inbreeding depression (Purfield *et al.*, 2012; Speed and Balding, 2015). However, few animals have been genotyped with that kind of panels in Argentina, while the information on microsatellites is already available at no additional cost. Therefore we considered worthwhile to evaluate the potential applications of this source of genomic information. To our knowledge, this is one of the first analyses that take advantage of the SRA genealogical and molecular databases to analyze genetic structure in a local herd in the way that is presented here.

One strong assumption when using marker information for the estimation of relatedness is that allele frequencies from the founder population remains unchanged (Toro *et al.*, 2011) whereas they are most likely modified by drift and selection. In fact, there is evidence that genomic regions harboring microsatellites are under selection in beef cattle, one example being marker ETH10 (DeAtley *et al.* 2011). Therefore, this molecular information should be interpreted under the premise that F estimated with microsatellites largely relies on IBS and probably overestimates relatedness. Even if this were the case, in a situation of missing genealogical information, molecular information could be an aid to get an approximate estimation of kinship (Figure 2) and genetic distances (Figure 3) and also to design mating schemes that minimize inbreeding. The estimation of inbreeding depression (Leroy, 2014) based on either genealogical or molecular data and using the phenotypic records from the Angus Genetic Evaluation Program could also give an appraisal of the usefulness of each source of information.

In this paper we have used useful genealogical and molecular information generated in the registration process to characterize the genetic structure of a herd that has been closely involved and has contributed to define the main features of the evolution of the Angus breed in Argentina. Cattlemen are not fully aware of the availability and potential applications of these resources, which can be deployed together with the better known genetic evaluation for the estimation of Breeding Values (as Expected Progeny Differences). Despite the worldwide wealth of genomic information in cattle, very few animals have been genotyped with high-density SNP panels in Argentina so far, making the microsatellite information a valuable asset. An SNP panel suitable for parentage verification has already been developed and ISAG is endorsing its application to eventually replace the microsatellite panel (ISAG, 2012). Fortunately, experimental strategies have been already implemented to connect both systems (McClure *et al.*, 2012). Independently of the molecular basis of the information, the rationale of the analysis described here will remain unchanged. Moreover, it could be applied to the entire breed.

REFERENCES

- Argentinean Angus Association (2014) <http://www.angus.org.ar/index.php> (accessed December 2014).
- Beef Improvement Federation (BIF) Guidelines (1996) North Carolina State University USA, Seventh ed., pp. 17–20.
- Boichard D., Maignel L., Verrier E. (1997) The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet. Sel. Evol.* 29: 5–23.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
- Caballero A., Toro M.A. (2002) Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3: 289–299.
- Chakraborty R., Jin L. (1993) Determination of relatedness between individuals using DNA fingerprinting. *Hum. Biol.* 65: 875–895.
- DeAtley K.L., Rincon G., Farber C.R., Medrano J.F., Luna Nevarez P., Enns R.M., Van Leeuwen D.M., Silver G.A., Thomas M.G. (2011) Genetic analyses involving microsatellite ETH10 genotypes on bovine chromosome 5 and performance trait measures in Angus and Brahman influenced cattle. *J. Anim. Sci.* 89: 2031–2041.
- Firpo Brenta L.M. (2003) Historia de la raza en el mundo y su evolución en la Argentina. In: Angus: La raza Líder. Asociación Argentina de Angus, Buenos Aires, pp. 9–28.
- Firpo Brenta L.M. (2012) Historial de las exposiciones de Palermo. *Revista Angus*, 257: 56–62.
- Goyache F., Gutiérrez J.P., Fernández I., Gómez E., Álvarez I., Díez J., Royo L.J. (2003) Monitoring pedigree information to conserve the genetic variability in endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 95–103.
- Gutiérrez J.P., Altarriba J., Díaz C., Quintanilla R., Cañón J., Piedrafita J. (2003) Pedigree analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35: 43–63.
- Gutiérrez J.P., Goyache F. (2005) A note on ENDOG: a computer program for analyzing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 357–360.
- Gutiérrez J.P., Royo L.J., Álvarez I., Goyache F. (2005) MolKinv2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *J. Hered.* 96: 718–721.
- ISAG (2012) Guidelines for cattle parentage verification based on SNP markers. <http://www.isag.us/Docs/Guideline-for-cattle-SNP-use-for-parentage-2012.pdf> (accessed February 2015).

- Kinghorn, B., Kinghorn, S. (2014) Pedigree Viewer.
<http://www-personal.une.edu.au/~bkinghor/pedigree.htm> (accessed July 2014).
- (accessed December 2014).
- Leroy G. (2014) Inbreeding depression in livestock species: review and meta-analysis. *Anim. Genet.* 45: 618–628.
- Malècot G. (1948) *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Masson et Cie, Paris, France.
- Márquez G.C., Garrick D.J. (2007) Selection intensities, generation intervals and population structure of red Angus cattle. *Proc. West. Sec. Am. Soc. Anim. Sci.* 58: 55–58.
- McClure M., Sonstegard T., Wiggans G., Van Tassell C.P. (2012) Imputation of microsatellite alleles from dense SNP genotypes for parental verification. *Front. Genet.* 3:140
- Molinuevo H.A. (2005) *Genética Bovina y producción en pastoreo*. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- Purfield D.C., Berry D.P., McParland S., Bradley D.G. (2012) Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genetics* 13: 70.
- Ritchie H. (2002) Historical review of cattle type. *Animal Science Staff Paper* 390, File No. 19.112 Michigan State University, U.S.A.
- Royo L.J., Alvarez I., Gutiérrez J.P., Fernández I., Goyache F. (2007) Genetic variability in the endangered Asturcón pony assessed using genealogical and molecular information. *Livest Sci.* 107: 162–169.
- Santana Jr M.L., Oliveira P.S., Eler, J.P. Gutiérrez J.P., Ferraz J.B.S. (2012) Pedigree analysis and inbreeding depression on growth traits in Brazilian Marchigiana and Bonsmara breeds. *J. Anim. Sci.* 90: 99–108.
- Sociedad Rural Argentina (2014) El cambio al ADN.
<http://www.sra.org.ar/rrgg/uploads/noticias/el%20cambio%20al%20adn%20bov-equil.doc>
- Speed D., Balding D.J. (2015) Relatedness in the post-genomic era: is it still useful? *Nat. Rev. Genet.* 16: 33–44.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 6.0. *Molec. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Toro M.A., García Cortés L.A., Legarra A. (2011) A note on the rationale for estimating genealogical coancestry from molecular markers. *Genet. Sel. Evol.* 43, 27.
- Wright S. (1969) *Evolution and the Genetics of Populations: The Theory of Gene Frequencies*, vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, USA.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Universidad Nacional de Mar del Plata, Project AGR377/12.

D-LOOP MITOCHONDRIAL GENETIC ANALYSIS IN ABEERDEN ANGUS OLD TYPE FROM ARGENTINA

ANÁLISIS GENÉTICO DEL BUCLE D EN ABERDEEN ANGUS TIPO ANTIGUO DE LA ARGENTINA

Villegas Castagnasso E.E.^{1,*}, Rogberg-Muñoz A.^{1,2,*}, Prando A.J.³, Baldo A.³, Giovambattista G.¹

¹Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), CCT La Plata-CONICET-Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 118 s/n, CC 296, 1900 La Plata, Argentina.

²Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

³Cátedra de Zootecnia Especial (II Parte), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

*Author for correspondence: eglevillegas@fcv.unlp.edu.ar

*Both authors contribute equally to this research

ABSTRACT

The massive use of reproductive breeding technologies (mainly Artificial Insemination and Embryo Transfer) resulted in an important decrease in the diversity in many breeds, and some genetic lines have been lost. Within the Angus breed, the “New Type” gain importance since 1970, leaving the “Old Type” to a reduced number of herds in the whole world. The objective of this work was to determine the genetic diversity in an “Old Type” herd in Argentina. DNA samples were analyzed for sequence variation in the hypervariable region of the mitochondrial DNA (D-loop). Sequence comparison and phylogenetic analyses revealed that haplotypes fell into European haplogroup (T3) in general, and in particular had high similarity with British haplotypes. Six distinct haplotypes were obtained, that differed from zero to four DNA bases with respect to the nodal sequence T3, with a nucleotide diversity of 0.442. Matrilineages genetic analysis suggested a Scottish origin of this herd. These results suggest that this herd could be a genetic reservoir of the Old Scottish Aberdeen Angus cattle.

Key words: mtDNA, *Bos Taurus*, Angus, matrilineages origin, genetic diversity

RESUMEN

La diversidad genética de numerosas razas se ha visto reducida por el uso masivo de las tecnologías reproductivas (principalmente la Inseminación Artificial y la Transferencia Embrionaria), incluso a llevado a la desaparición de algunas líneas genéticas. En la raza Angus, desde 1970 el tipo *New Type* se popularizó y el luego llamado *Old Type* quedó reducido a pocos rodeos en el mundo. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética de un rodeo de Argentina considerado *Old Type*. La secuencia de la región Hipervariable del ADN mitocondrial (D-loop) fue analizada en muestras de ADN obtenidas de estos animales. Los resultados mostraron que todas las secuencias fueron incluidas dentro del haplogrupo europeo (T3) y presentaban una alta homología con los haplotipos reportados en animales británicos. En este rodeo se encontraron seis haplotipos distintos que presentaban cero a cuatro bases de ADN de diferencia con el consenso nodal (T3) y una diversidad nucleotídica estimada en 0,442. El análisis de los linajes maternos sugiere un origen Escocés de este rodeo en su genealogía materna, consistente con los registros genealógicos. Estos resultados son una evidencia para considerar a este rodeo como un reservorio del ganado Aberdeen Angus Escocés antiguo.

Palabras clave: ADN mitocondrial, *Bos Taurus*, Angus, linaje materno, diversidad genética

Fecha de recepción: 09/12/2014
Fecha de aceptación de versión final: 23/06/2015

INTRODUCTION

The Aberdeen Angus breed was developed at the beginning of the 19th century in Northeast Scotland. Due to its remarkable productive attributes, the Aberdeen Angus breed spread quickly in Great Britain, Ireland, United States, Canada, Australia and New Zealand. This type of polled hardy cattle, black or red coated, was characterized for its precocity, excellent fertility and maternal aptitude, high growth rate and excellent meat yield with insurmountable meat quality (Aberdeen Angus Cattle Society, 2014). In those years, the breed stood out because the animals were phenotypically short in height, short from head to tail, deep from back to ribs, compact and with large fat deposits. This animal type will be later called “Old Type” or “Traditional Type”, standing this for the original type that was brought from Scotland (Rare Breeds Conservation Society of New Zealand, 2014). Opposed to this, in the United States and Canada a “New Type” was developed in the decades of 1960 and 1970. The breed was selected attending to the needs of the feedlot industry in the USA, this “New Type” includes animals that are of a larger size, more muscular, more cylindrical in shape, with a higher birth weight and leaner carcasses in comparison with the “Old Type”. The “New Type” was spread all over the world, and has influenced almost every Angus herd, leaving Old Type animals in a reduced number of herds (Asociación Argentina de Angus, 2014).

In 1879, the breed was introduced in Argentina when Mr. Carlos Guerrero imported the first pedigree bull (named Virtuoso) and two heifers (Asociación Argentina de Angus, 2014). Initially, the Angus breed had no further dissemination but, around 1950, the number of Angus breeders and animals increased in all temperate regions, being actually the most important breed in Argentina (60% of all animals in the country). It absorbed Shorthorn; Creole and other breeds due to its original characteristics that made it suitable for pastures, still the most important cattle production system in Argentina. Since 1970, as in the rest of the world, the “New Type” gained importance in Argentine despite the fact that this biotype was selected for a different production system. Furthermore, with the massive use of reproductive breeding technologies (Artificial Insemination and Embryo Transfer), the genetic diversity of many breeds has significantly decrease (Taberlet *et al.*, 2008) and some genetic lines have been lost. In this context, few Argentinean breeders closed their herds

(with great prevalence of Scottish blood) to the influence of the American “New Type”, preserving intact all the characteristics of the “Old Type”, and keeping them as true genetic reservoirs. Such reservoirs are currently used to restore the adaptability to pasture systems, lost due to the “New Type” influence. Even though it is quite difficult to trace them back to the original imports to Argentina, these herds have maintained the characteristics of the original Angus because no blood from any other herd has been introduced into them since the decade of 1960.

Mitochondrial DNA sequence polymorphisms have been used to examine genetic relationship within breeds (Giles *et al.*, 1980; Hauswirth and Laipis, 1982; Hill *et al.*, 2002), among breeds (Bradley *et al.*, 1996; Beja-Pereira *et al.*, 2006; Lirón *et al.*, 2006), and between domestic and wild populations (Oakenfull and Ryder, 1998). In order to establish a likely Scottish origin of some Old Type animals kept in Argentina, the D-loop mtDNA was analyzed and compared with previously reported Angus sequences from various countries.

MATERIALS AND METHODS

Animals and DNA extraction

Blood samples were collected from twenty Angus animals raised in a herd belonging to “Cabaña El Hinojo de Bru”, located in Coronel Suárez County (Buenos Aires Province, Argentina, 37° 26' 46" S 61° 53' 21" W). This herd was founded around 1960 with a pedigree of Angus Dams (Scottish origin) and an imported Scottish bull. Thereafter, the herd was kept close reproductively until the present, except for some Scottish semen or bulls used to reduce consanguinity. DNA was extracted from lymphocytes using DNAzol® method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

D-loop sequencing and sequence analysis

D-loop of mtDNA hypervariable region I (nucleotide positions 16,023 -16,262) was amplified using primers L15960 (5'-GGTAATGTACATAACATTAATG-3') and H16334 (5'-CGAGATGTCTTATTAAAGAGG-3') as suggested by Troy *et al.* (2001). All sequences were obtained for both DNA strands using the DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA) in a 10 μ l volume, containing approximately 40ng of purified DNA and 5pmol of primer. Sequencing was performed using a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare).

Raw sequences were edited and aligned using MegaBACE Sequence Analyzer (GE Healthcare). The resulting sequences of the D-loop were then aligned with other 67 published sequences from Argentina, Britain, Canada, China, Japan and USA (Loftus *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1996; Troy *et al.*, 2001; Komatsu *et al.*, 2004; Shahid *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2006; Ginja *et al.*, 2010), using CLUSTAL-X multiple alignment software (Thompson *et al.*, 1997).

Variations in the D-loop region were defined by direct comparison with the reference bovine mtDNA sequence (Accession No.V00654) published by Anderson *et al.* (1982). This haplotype corresponds to the predominant European T3 mtDNA haplotype as defined by Troy *et al.* (2001). A Median Joining Network was constructed using the methodology described in Bandelt *et al.* (1995) using Network 4.1.1.2 (Flexus-Engeneering, 2014). Mean number of pairwise differences and nucleotide diversity were calculated using the algorithms implemented into Arlequin 3.5 analysis package (Excoffier and Lischer, 2010).

RESULTS

Sequence analysis of 240bp revealed seven polymorphic sites included, one transversion and six transitions (Table 1). Among them, one was a new polymorphic site on 16,257 (T/G) and three were only shared with the British reported animals (16,062 A/G, 16,200 G/A, 16,208 T/C), among all Angus sequences reported up to date. Nucleotidic diversity was 0.004, and pairwise nucleotide difference was 1.026.

Six haplotypes were found that differed from zero to four bases respect to the nodal sequence T3 (Table 1). Nucleotide sequence comparisons and phylogenetic analysis assigned haplotypes to European group (T3) in general, and in particular had high similarity with British haplotypes. Three haplotypes were original and appeared in low frequency; among the rest, one was the nodal consensus (T3) and the other two had already been observed in British populations. None of these animals had showed haplotypes assigned to the African (T1), Near East (T2), or Cebuine (I) haplogroups.

Comparison of 67 published Angus sequences for D-loop and the Argentinean “Old Type” sequences are presented in Table 2. Reported sequences are grouped by taking into account only the region (240bp) studied here.

The Median Joining Network is also presented using that information (Figure 1).

DISCUSSION

The fact that this population remained completely close regarding mtDNA -no females were incorporated to the herd for almost 60 years- is revealed by the appearance of a low number of haplotypes. Probably the effective founder population was small and some haplotypes could have been lost. However, three of the haplotypes had two to four mutations when compared with T3, and appeared in a considerable frequency. This explained that both, nucleotidic diversity (0.442) and mean number of pairwise differences (3.091), were higher than those calculated for Britain Angus (nucleotidic diversity= 0.218, mean number of pairwise differences= 2.835), all Angus sequences reported (nucleotidic diversity= 0.122, mean number of pairwise differences= 3.047) and European *Bos taurus* (nucleotidic diversity= 0.022, mean number of pairwise differences= 2.529).

Most of the polymorphic sites and haplotypes found were original or shared with the British population. In particular, one out of seven polymorphic sites was original, and the rest also appeared in British Angus, and three of them were exclusive of these two populations. The haplotypes showed a similar pattern, the three new haplotypes had low frequencies; the other three -the most frequent- were the consensus (T3) and two other haplotypes had also been described by Troy *et al.* (2001) for the British populations. Again, one of the haplotypes was only shared by the “Old Type” and the British Angus. These observations support the hypothesis of a British origin of the population under study, at least from the maternal side, and the lack of American genetic influence in the herd.

The sequences were also compared with Creole reported sequences and haplogroups T1, T2 and I. None of the new original sequences were assigned to those haplogroups or this breed. Based on this observation, we discard the possibility that the animals in this herd have Creole ancestry in the maternal lineage. This is important because many actual older Angus herds were originally obtained and expanded, by absorbing other breeds with Angus bulls. Furthermore, the sequences were compared with reported sequences of Shorthorns (Ginja *et al.*, 2010), and neither of the haplotypes were found in those

Table 1. D-loop polymorphic sites founded in Argentinean Angus Old Type population

* The sequence position from BOVMT GenBank sequence is given above each column (Anderson et al., 1982).

Sequence	POLYMORPHIC SITES *							Number of animals	Reference
	16062	16109	16200	16208	16247	16255	16257		
T3	A	T	G	T	C	T	T		Consensus
AA1	-	-	-	-	-	-	G	1	This paper
AA2	-	C	-	-	-	-	-	2	This paper
AA3	G	-	A	C	-	-	C	3	This paper
AA4	G	-	A	C	T	-	-	4	Troy <i>et al.</i> 2001
AA5	-	-	-	-	-	-	-	5	Anderson <i>et al.</i> 1982
AA6	-	C	-	-	-	C	-	5	Troy <i>et al.</i> 2001

Table 2. Comparison of 67 published Angus sequences for D-loop with the Argentinean "Old Type" sequences

Sequence Pubmed ID	Population	Differences with T3	16039	16042	16050	16053	16056	16057	16058	16062	16067	16068	16083	16094	16095	16096	16109	16112	16113	16119	16121	16122	16127	16135	16138	16139	16141	16143	16147	16167	16200	16208	16219	16229	16231	16232	16247	16250	16255	16257
Consensous (T3)	Europe		A	T	C	T	A	G	C	A	T	A	C	T	G	T	T	T	G	T	C	T	T	C	T	A	C	G	T	C	A	C	C	C	A	T				
EF990788-EF990789-EF990790-GU338237-GU338238	"Old Type"	0			
EF990787	"Old Type"	1			
GU338242-GU338243	"Old Type"	1	C			
EF990791-EF990792-GU338239-GU338240-GU338241	"Old Type"	2	C	C	.			
EF660565-EF660566-EF660567-EF990786	"Old Type"	4	G	A	C	T	.				
GU338244-GU338245-GU338246	"Old Type"	4	G	A	C	.	C	.				
AF336464-AF336465-AF336472-L27712-U51816	Britain	0			
AF336471	Britain	1	A			
AF336466-L27713	Britain	2	C	.	.	T	C	.		
AF336470	Britain	2	C	C	.		
AF336473	Britain	2	T	G	.	.			
AF336467-AB336468-U51819	Britain	3	.	T	.	.	T	C	A	C	.	
AF336469	Britain	4	G	T	.	.	
FJ815941-FJ815943-FJ815945-FJ815946-FJ815947-FJ815950	Argentina	0		
FJ815940	Argentina	1	G		
FJ815948	Argentina	1	A	.	.	
FJ815949	Argentina	1	T		
FJ815951	Argentina	2	C	C	C	.			
FJ815944	Argentina	5	.	T	C	.	.	C	.	.	T	C	C	.			
FJ815942	Argentina	6	.	T	G	.	.	C	C	.	T	C	.	T	C	.	C	.				
AF034445	Canada	3	C	C	.	T		
DQ520587-DQ520588-DQ660307	China	0		
DQ520590	China	4	A	.	.	C	.	.	C	C	.		
DQ520591	China	4	T	C	.	C	C	.			
DQ520589	China	5	.	T	C	.	.	C	.	C	C	.	C	.	C	T	C	.						
AB079347-AB079348	Japan	0			
AB079345	Japan	2	A	.	.	C		
AB079346	Japan	2	G	.	.	C	.	.	C		
AB079344	Japan	3	A	.	.	C	.	C	.	C	.	C	C	.	.			
AY676663-AY676664-AY676665-AY676666	USA	0		
FJ815927-FJ815928-FJ815931-FJ815932	USA	1	C	C	.		
FJ815933-FJ815934-FJ815937-FJ815939	USA	1	A	T	.			
AY676659	USA	1	C		
AY676665-FJ815929	USA	1	A		
AY676666	USA	1	C	T	.
AY676672	USA	1	.	C	A		
FJ815930	USA	1	C		
FJ815936	USA	1	C	T	.	
AY676657	USA	2	.	C	C	.	.	C	C	.			
AY676662	USA	2	C	.	.	C	.	.	C	.	.	C	C	.		
AY676667-AY676670-FJ815926-FJ815932	USA	2	C	.	.	C	.	.	C	.	.	C	C	.		
AY676673	USA	2	.	G	C	.	.	C	.	.	C	G	.			
FJ815925	USA	2	.	G	C	.	.	T	.	.	T	G	.			
FJ815935	USA	2	.	C	C	.	.	T	.	.	T	T	T	.		
AY676668-AY676669	USA	3	.	C	C	.	.	C	.	.	C	T	T	.		

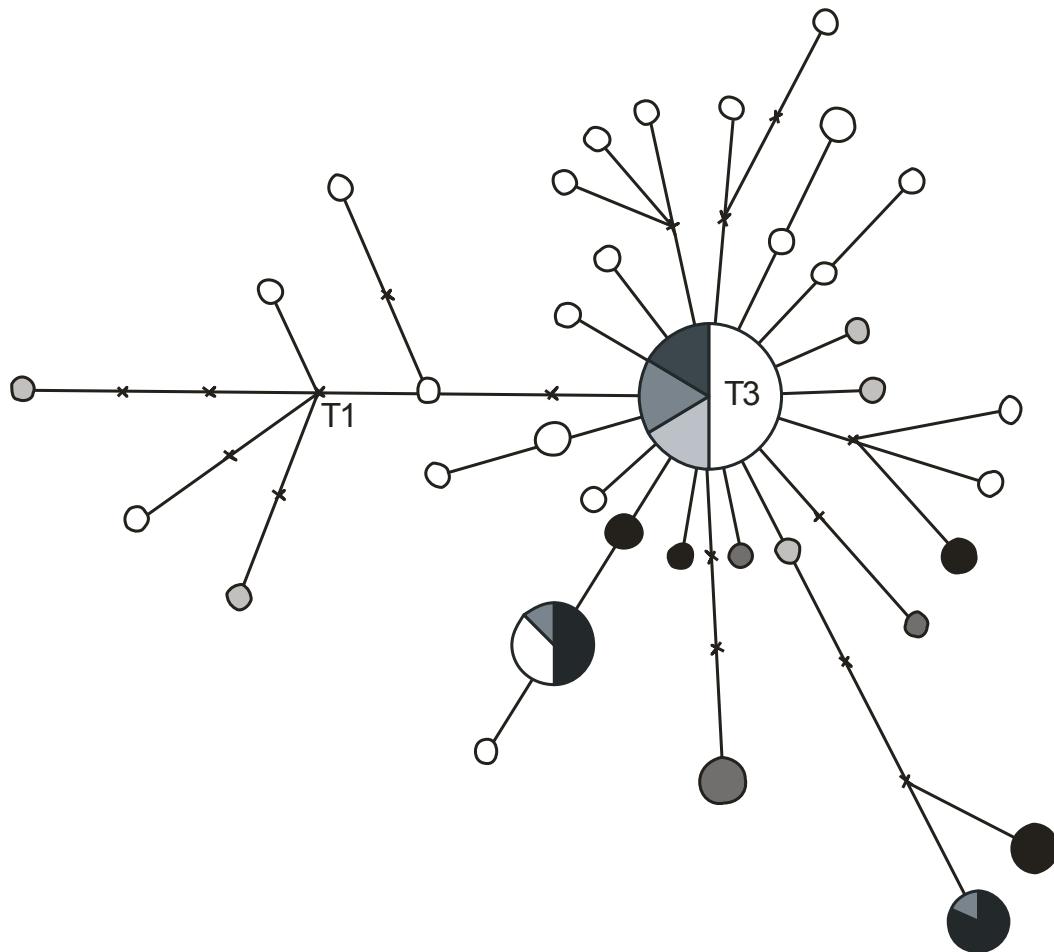


Figure 1. A reduced Median Joining Network (Bandelt et al., 1995) featuring mtDNA sequences from 87 Angus. Circles represent sequences haplotypes: the area is proportional to the frequencies of the haplotype. Black represents “Old Type” Angus sequences, dark gray represents British Angus, light gray represents Argentine Angus, and white represents remaining Angus sequences. The consensus nodes T1 (African) and T3 (European) are indicated.

sequences, excluding also a male mediated absorption from the Shorthorn breed, which was the most numerous breed in the first half of the XXth century in Argentina.

Previous SNP genetic studies of this herd, in autosomic genes involved in fat metabolism and growth (Villegas-Castagnasso *et al.*, 2006), showed important frequency differences between this population and a sample of Argentinean Angus obtained from several herds, most of them classified as “New Type”. In addition, the phenotype of this herd remains almost unchanged from

the Traditional Aberdeen Angus phenotype described by Rare Breeds Conservation Society of New Zealand (2014). The phenotypic and genetic data analysed suggest that this herd could be considered as Angus “Old Type”, and could be a reservoir of the Old Scottish Aberdeen Angus. Even though there was an absence of “New Type” influence with the markers employed, further studies with other markers should be carried out to be able to consider that this herd is of “pure Old Type” descendent.

REFERENCES

- Aberdeen Angus Cattle Society (2014) <http://www.aberdeenganus.co.uk> (accessed October 2014).
- Anderson S., DeBruijn M.H.L., Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F., Young I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.
- Asociación Argentina de Angus (2014) <http://www.angus.org.ar> (accessed October 2014).
- Bandelt H.J., Forster P., Sykes B.C., Richards M.B. (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141(2): 743-53.
- Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetti J., Barbujani G., Luikart G., Bertorelle G. (2006) The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8113-8.
- Bradley D.G., Machugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5131-5135.
- Excoffier L. and Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources* 10: 564-567.
- Flexus-Engeneering (2014) www.fluxus-technology.com (accessed October 2014).
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (11): 6715-9.
- Ginja C., Penedo M.C.T., Melucci L., Quiroz J., Martínez López O.R., Revidatti M.A., Martínez-Martínez A., Delgado J.V., Gama L.T. (2010) Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Anim. Gen.* 41 (2): 128-141.
- Hauswirth W.W., Laipis P.J. (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (15): 4686-90.
- Hill E.W., Bradley D.G., Al-Barody M., Ertugrul O., Splan R.K., Zakharov I., Cunningham E.P. (2002) History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Anim. Genet.* 33 (4): 287-94.
- Komatsu M., Yasuda Y., Matias J.M., Niibayashi T., Abe-Nishimura A., Kojima T., Oshima K., Takeda H., Hasegawa K., Abe S., Yamamoto N., Shiraishi T. (2004) Mitochondrial DNA polymorphisms of D-loop and four coding regions (ND2, ND4, ND5) in three Philippine native cattle: indicus and taurus maternal lineages. *Anim. Sci. J.* 75: 363-378.
- Lirón J.P., Bravi C.M., Mirol P.M., Peral-García P., Giovambattista G. (2006) African matrilineages in American Creole cattle: evidence of two independent continental sources. *Anim. Genet.* 37: 379-82.
- Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham E.P. (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2757-2761.
- Meng Y. (2006) Pubmed Sequences ID: DQ660307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed October 2014).
- Oakenfull E.A., Ryder O.A. (1998) Mitochondrial control region and 12S rRNA variation in Przewalski's horse (*Equus przewalskii*). *Anim. Genet.* 29 (6): 456-9.
- Qu K.X., Yang G.R., Yuan X.P., Jin X.D., Huang B.Z., Wen J.K. (2006) Pubmed Sequences ID: DQ520587 to DQ520591. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed October 2014).
- Rare Breeds Conservation Society of New Zealand (2014) <http://www.rarebreeds.co.nz/angus.html> (accessed October 2014).

Shahid S.A., Khan S., Feng D., Johnson G.S. (2004) Pubmed Sequences ID: AY676862 to AY676873. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed October 2014).

Taberlet P., Valentini A., Rezaei H.R., Naderi S., Pompanon F., Negrini R., Ajmone-Marsan P. (2008) Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol. Ecol.* 17 (1): 275–84.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24): 4876–82.

Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C., Bradley D.G. (2001) Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410 (6832): 1088–91.

Villegas-Castagnasso E.E., Kienast M., Ripoli M.V., Prando A.J., Francisco E.I., Rogberg-Muñoz A., Sorarain N., Baldo A., Peral-García P., Giovambattista G. (2006) Comparación de la variabilidad genética de los genes DGAT1, TG, LP, SCD y GH en diferentes tipos de bovinos de la raza Aberdeen Angus de Argentina. *Comunicaciones Libres XXXV Congreso Argentino de Genética*, 24–27 setiembre 2006, San Luis, Argentina; pp.161.

ACKNOWLEDGMENTS

The research for this paper was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) and Universidad Nacional de La Plata (UNLP). The authors acknowledge Cabaña El Hinojo de Bru (Coronel Suárez, Provincia de Buenos Aires) for facilitating the animals for the research.

GENOTYPE-ENVIRONMENT INTERACTION AND STABILITY IN FORAGE YIELD OF TRITICALE AND TRICEPIRO

INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE Y ESTABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE FORRAJE DE TRITICALES Y TRICEPIROS

Ferreira V.¹, Grassi E.¹, Ferreira A.¹, di Santo H.¹, Castillo E.¹, Paccapelo H.^{2,*}

¹ Facultad de Agronomía y Veterinaria, UN de Río Cuarto.

² Facultad de Agronomía, UN de La Pampa.

* Author for correspondence
paccapelo@agro.unlpam.edu.ar

ABSTRACT

Triticales and tricepiros are annual forage alternatives of winter cereals for the subhumid-semiarid pampean region of Argentina. Triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) derived from *Triticum* L. \times *Secale* L. crosses in broad sense. Tricepiro is the common name of the trigeneric hybrids obtained from crosses between triticales and trigopiros (*Triticum* L. \times *Thinopyrum* Á. Löve). The aim of this study was to analyze forage yield, genotype-environment interaction and stability in experimental strains. Twenty-three genotypes were tested for five years in Río Cuarto, Córdoba and Santa Rosa, La Pampa, Argentina, using a random complete block design. The genotype, environment and genotype-environment interaction main effects were determined by ANOVA. All of them were statistically significant. The stability was assessed using regression analysis, P_i index and AMMI₂ and SREG models. A strain of triticale had high performance and low genotype-environment interaction with all methods. Another triticale strain showed high yield and stability in regression analysis and P_i index, high yield but low stability in AMMI, and high performance in only one environment according to SREG. Regarding tricepiro, four strains of higher than average forage yield were stable according to the regression method. However, the P_i index qualified only one as stable and all of them were unstable in AMMI analysis. The SREG method qualified one of these tricepiro strains as stable with high yield, another with median stability and good yield but near the average, and the remaining two were qualified as unstable. The combination of regression and SREG analyses was the most appropriate to analyze stability of these materials. Three strains were identified to be released as cultivars.

Key words: hybrid triticeas, forage yield, genotype-environment interaction, stability

RESUMEN

Triticales y tricepiros son alternativas forrajeras anuales que diversifican la oferta de cereales invernales. El triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) es producto de la crusa de *Triticum* L. \times *Secale* L. en sentido amplio. Tricepiro es el nombre vulgar de las combinaciones trigénéricas obtenidas por cruzamientos entre triticales y trigopiros (*Triticum* L. \times *Thinopyrum* Á. Löve). El objetivo de este trabajo fue analizar la interacción genotipo-ambiente y la estabilidad del rendimiento en forraje de líneas experimentales. Se emplearon 23 genotipos evaluados durante cinco años en Río Cuarto, Córdoba y Santa Rosa, La Pampa, Argentina, empleando un diseño en bloques completos al azar. Mediante ANAVA se determinaron los efectos principales genotipo, ambiente y la interacción genotipo-ambiente, los cuales fueron estadísticamente significativos. La estabilidad se determinó mediante análisis de la regresión, índice P_i y modelos AMMI₂ y SREG. Una línea de triticale resultó de alto rendimiento y escasa interacción genotipo-ambiente con todos los métodos, mientras que otra, de alto rendimiento y muy estable según la regresión y el índice P_i , resultó de muy buen rendimiento pero poco estable según AMMI y de alto rendimiento sólo en un ambiente según SREG. Respecto a las líneas de tricepiro, cuatro de rendimiento superior al promedio resultaron estables según el método de la regresión pero el índice P_i calificó como estable a sólo una y en el AMMI todas resultaron inestables. En el análisis SREG una resultó estable y rendidora, otra tuvo mediana interacción genotipo-ambiente y rendimiento superior pero muy cercano a la media, y las restantes resultaron inestables. La combinación de regresión y SREG resultó la más apropiada para analizar estabilidad en estos materiales. Los análisis permitieron identificar tres líneas para su registro como cultivares.

Palabras clave: triticeas híbridas, forraje, interacción genotipo-ambiente, estabilidad

Fecha de recepción: 30/10/2014
Fecha de aceptación de versión final: 22/04/2015

INTRODUCCIÓN

Triticales y tricepiros son dos alternativas forrajeras anuales que diversifican la oferta de los cereales invernales. El triticale (x *Triticosecale* Wittmack) es producto de la cruce de *Triticum* L. \times *Secale* L. en sentido amplio, obtenido con la finalidad de reunir la calidad del trigo con la rusticidad del centeno. Originalmente se han desarrollado dos tipos: los $2n=8x=56$ derivados de *T. aestivum* \times *S. cereale* (composición genómica AABBDDRR) y los $2n=6x=42$ provenientes de *T. turgidum* \times *S. cereale* (AABBRR). Los 6x han demostrado mejores aptitudes agronómicas, muy buenos rendimientos de forraje y grano, excelentes cualidades nutricionales y amplia adaptabilidad a ambientes geográficos diversos, motivos por los cuales se les ha dedicado el mayor esfuerzo de mejoramiento (Varughese *et al.*, 1987; Mergoum *et al.*, 2004).

El tricepiro constituye otra alternativa forrajera invernal, más reciente y poco difundida. Tricepiro es el nombre vulgar aplicado por Covas (1976) a las combinaciones trigenéricas obtenidas a través de cruzamientos entre triticales (*Triticum* L. \times *Secale* L.) y trigopiros (*Triticum* L. \times *Thinopyrum* Á. Löve). Este híbrido se desarrolla buscando combinaciones de la calidad del trigo con la rusticidad del centeno y agropiro, con destino de uso y región de empleo similares al de los triticales (Covas, 1976; Ferreira y Szpiniak, 1994). La formación más común es entre triticales 6x (AABBRR) y trigopiros 8x (AABBDDJJ), que se estabilizan en el nivel 6x, con introgresión de *Thinopyrum* en el genotipo A y retención del genotipo R del centeno (Ferrari *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007; Fradkin *et al.*, 2009).

El triticale presenta variabilidad para desarrollar cultivares destinados a diferentes regiones y se adapta a gran diversidad de ambientes (Dogan *et al.*, 2011; Arseniuk, 2013). Tiene múltiples usos potenciales y puede emplearse en la alimentación humana y animal (Peña, 2004; Myer y Lozano del Río, 2004). El uso principal en la mayor parte del mundo es como grano forrajero en la alimentación animal. En la Argentina se emplea para consumo fresco, henificado y como grano forrajero. Los tricepiros tienen similar destino.

La diversificación de cultivos en un agrosistema contribuye a asegurar la producción y el balance de los componentes del mismo. Esto es particularmente válido en áreas con características atmosféricas y edáficas subóptimas como la región pampeana subhúmeda seca-semiarida de la Argentina. Triticales y tricepiros son alternativas para la diversificación, aportando forraje fresco y grano en los sistemas ganaderos durante la época invernal, de escasas precipitaciones y heladas

intensas (Covas, 1989; Grassi *et al.*, 2011). La zona de uso actual de estas tritíceas híbridas se encuentra en el Oeste de la provincia de Buenos Aires, Este de La Pampa, Sur de Córdoba y Este de San Luis, región delimitada por las isohietas de 850 mm al Este y de 400 mm hacia el Oeste y climáticamente muy inestable.

Los triticales se han difundido en la Argentina para uso forrajero en invernada, recria y tambo, tanto para pastoreo directo, henificado o como grano forrajero. Se han publicado numerosos trabajos de evaluación del rendimiento en forraje (Tomaso, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2012; Kloster *et al.*, 2013) entre los más recientes. Se han registrado 26 cultivares de triticale, 22 de los cuales fueron originados por la labor de fitomejoramiento en el sector público (INTA y Universidades Nacionales de Río Cuarto, Córdoba y La Pampa), y 4 en el sector privado, con dos de ellos inhabilitados para su comercialización (INASE, 2014). La mayoría de los cultivares fueron registrados en las dos últimas décadas y prácticamente todos han sido seleccionados con objetivo de doble propósito.

Respecto a los tricepiros, las fuentes de germoplasma originales se obtuvieron en la EEA Anguil (La Pampa) y la UN de La Pampa y, posteriormente en la UN de Río Cuarto, habiéndose efectuado estudios que abarcan la citología, reselecciones del material pampeano original, obtención de nuevas cruzas y líneas y pruebas de producción de biomasa seca (Tosso *et al.*, 1997; 2000; Grassi *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2012; Ferreira, A. *et al.*, 2012; Ferreira, V. *et al.*, 2012). El área potencial de difusión y los usos posibles son muy similares a los del triticale, pero la difusión del cultivo es aún escasa, contribuyendo a ello la existencia de un solo cultivar, Don René INTA, registrado en 1994 y la no disponibilidad de semilla.

La expansión de cultivos como triticale y tricepiro en la región mencionada puede facilitarse caracterizando las líneas experimentales por su respuesta ante diferentes condiciones ambientales, para lo cual es necesario estudiar la interacción genotipo-ambiente (IGA), comúnmente conocida como la respuesta diferencial de los genotipos frente a condiciones ambientales diversas, la estabilidad y adaptabilidad, particularmente importante en caracteres cuantitativos, que normalmente altera el orden de mérito de los materiales causando dificultades en la selección (Flores *et al.*, 1998).

Los ensayos comparativos de rendimiento multiambientales contribuyen al conocimiento de la adaptación de nuevo germoplasma a las características edáficas y atmosféricas de amplios ambientes (Zobel *et al.*, 1988). La recomendación

de genotipos basados en rendimientos modelados a partir de las observaciones en diferentes localidades y años reducen el error experimental que afecta la estimación del rendimiento, favorecen la predicción de las futuras respuestas en cada sitio y simplifican las recomendaciones de cultivares o líneas pasibles de registro.

Los procedimientos desarrollados para cuantificar la interacción genotipo-ambiente (IGA) se conocen genéricamente como modelos para analizar la estabilidad y, en términos agronómicos, todos tienden a verificar el comportamiento y poder efectuar recomendaciones sobre los resultados de programas de mejoramiento cuando se emplean múltiples ambientes de evaluación.

Existen diferentes criterios y métodos para analizar la IGA y la estabilidad. Entre los métodos paramétricos univariados, se utilizan el coeficiente b_i de la regresión lineal y los desvíos S^2_d (Finlay y Wilkinson, 1963; Eberhart y Russell, 1966) y el índice de estabilidad P_i de Lin y Binns (1988). Otros métodos no paramétricos y multivariados utilizan representaciones visuales. El modelo de Efectos Aditivos Principales e Interacciones Multiplicativas (AMMI) representa genotipos y ambientes en un gráfico bidimensional GA *biplot* (Gauch, 2006), mientras la regresión por sitio (SREG) (Cornelius *et al.*, 1996) expresa la respuesta en función de G+IGA, que se interpreta a través de gráficos GGA *biplots* (Yan *et al.*, 2000).

El presente estudio fue conducido para evaluar el comportamiento de germoplasma de tríticales y tricepiros en ensayos multi ambientales. El objetivo específico fue analizar la IGA y la estabilidad del rendimiento de forraje mediante diferentes métodos univariados y multivariados y, a partir de ello, contribuir a la toma de decisiones respecto a la conveniencia de registrar alguna línea como futuro cultivar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 23 líneas experimentales o variedades (en adelante, genotipos), 14 de tríticale y nueve de tricepiro, de diversos orígenes y todos seleccionados para producción de materia seca. Tríticales: nueve de origen CIMMYT México reseleccionados en Río Cuarto, tres cultivares nacionales registrados y dos reselecciones de cvs. registrados. Tricepiros: ocho líneas experimentales, cuatro de origen UN Río Cuarto y cuatro de origen UN La Pampa y un cv. registrado por el INTA.

Los materiales se probaron durante el período 2008-2012 en las localidades de Santa Rosa (La Pampa = SR,

36° 37' S, 64° 17' W) y Río Cuarto (Córdoba = RC, 33° 04' S, 64° 38' W), lo que cual generó diez ambientes año por localidad. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones en cada sitio y año de evaluación. La parcela experimental consistió de siete surcos de 5,50 m de largo y una separación entre surcos de 0,20 m (7,70 m²). Las siembras se efectuaron en la primera quincena de marzo.

Se cosecharon los 5 m² centrales de cada unidad experimental con motosegadora manual. La altura de corte fue a nueve cm del suelo cuando el promedio de los participantes alcanzó alrededor de 25 cm de altura; se realizaron tres cortes durante el ciclo productivo. En cada corte se extrajo una alícuota de 200 g de materia verde que se llevó a estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso constante. El peso seco resultante se proyectó a materia seca en kg ha⁻¹. La Materia Seca acumulada durante el ciclo productivo se analizó con la suma de los tres cortes.

Análisis estadístico

Los efectos principales genotipo (G), ambiente (A) y la interacción genotipo x ambiente (IGA) del rendimiento de forraje de los genotipos (efectos fijos) se analizaron mediante ANAVA y prueba de diferencias mínimas significativas al 5 %. La adaptabilidad y estabilidad de los genotipos en los distintos ambientes se estimó por análisis de la regresión, índice de superioridad P_i , el modelo AMMI₂ (GA *biplot*) y el modelo SREG (GGA *biplot*).

El modelo de análisis de regresión de Eberhart y Russell (1966) es: $Y_{ijk} = \mu + \beta_i I_j + \delta_{ij}$, donde:

Y_{ij} = media del genotipo i ($i = 1, 2, \dots, v$) en el ambiente j ($j = 1, 2, \dots, n$);

μ = media del i -ésimo genotipo en el j -ésimo ambiente; β_i = coeficiente de regresión; mide la respuesta del i -ésimo genotipo a la variación ambiental;

I_j = índice ambiental obtenido como el promedio de todas las variedades en el j ambiente menos la media general, y

δ_{ij} = desviación de la línea de regresión del i -ésimo genotipo sobre I_j en el j -ésimo ambiente.

Finlay y Wilkinson (1963) sostienen que, en la regresión lineal, los genotipos con $b_i < 1$ tienen estabilidad inferior a la media y se adaptan a ambientes de baja calidad; los que tienen $b_i > 1$ presentan estabilidad superior al promedio y se adecuan a ambientes de alta calidad, y aquellos que con $b_i = 1$ exhiben una estabilidad promedio y tendrán buena o

mala adaptación según presenten alto o bajo rendimiento. Eberhart y Russell (1966) agregan al método los desvíos de la regresión “ $S^2 d_i$ ” para contemplar el componente no lineal del ambiente y sugieren que un genotipo es estable cuando tiene $b_i = 1$ y $S^2 d_i = 0$ pero pueden darse diferentes situaciones respecto a la adaptabilidad y estabilidad según los valores de b_i y la significación de los desvíos, que se describen a continuación.

b_i	$S^2 d_i$	Adaptación	Estabilidad
≥ 1	ns	ambiente de alta calidad	estables
≥ 1	**	ambiente de alta calidad	inestables
$= 0$	ns	general a todos los ambientes	estables
$= 0$	**	general a todos los ambientes	inestables
≤ 1	ns	ambientes pobres	estables
≤ 1	**	ambientes pobres	inestables

El Índice P_i de Lin y Binns (1988) se calculó como $P_i = \sum (Y_{ij} - M_j)^2 / 2a$, donde:

P_i = índice de estabilidad y superioridad del genotipo i ;

Y_{ij} = rendimiento del i -ésimo genotipo en el j -ésimo ambiente;

M_j = rendimiento medio máximo en el j -ésimo ambiente;

a = cantidad de ambientes.

La expresión P_i incluye en el primer término la suma de cuadrados del efecto principal G y en el segundo la suma de cuadrados de la IGA cuando se comparan dos cultivares. La expresión M_j representa el máximo rendimiento encontrado y P_i el cuadrado medio de los desvíos de cada valor respecto al máximo. Por ello, el menor P_i identifica el mejor genotipo porque es el que menos se aleja del máximo y revela superioridad en términos de adaptabilidad general dado que se mide empleando todos los ambientes (Lin y Binns, 1988).

El modelo de Efectos Principales Aditivos e Interacción Multiplicativa (AMMI₂) (Gauch y Zobel, 1996) es: $Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + \sum_{n_k k_k k_k} + R_{ij}$, donde Y_{ij} = rendimiento del i -ésimo genotipo en el j -ésimo ambiente.

Los parámetros aditivos son:

μ = media general;

g_i = desviación de la media de los genotipos, y

e_j = desviación de las medias de los ambientes.

Los parámetros multiplicativos son:

λ_k = valor singular para cada Análisis de Componentes Principales (ACP);

n = número de componentes principales retenidos en el modelo;

$a_{ik} Y_{ik}$ = calificación del ACP para el k -ésimo eje del i -ésimo genotipo y j -ésimo ambiente respectivamente, y

R_{ij} = residual del modelo.

Los modelos AMMI se basan en análisis estadísticos combinados. Primero se realiza un ANAVA y luego se efectúa el análisis de componentes principales (ACP). Mediante el primero se estudian los efectos principales de genotipos (G) y ambientes (A), en tanto que la IGA se analiza de forma multivariada a través de la representación simultánea de genotipos y ambientes en un gráfico bidimensional o *biplot* (Gauch y Zobel, 1996; Gauch, 2006).

Los genotipos o ambientes que tienen coordenadas altas, positivas o negativas para el primer CP hacen un aporte mayor a la IGA que aquellos con valores cercanos a 0. El efecto de interacción entre un genotipo y un ambiente está dado por la proyección ortogonal del vector del genotipo sobre la dirección determinada por el vector del ambiente. Aquellos vectores de ambientes y genotipos que presentan la misma dirección tienen interacción positiva, es decir dichos ambientes son favorables para esos genotipos; por el contrario los vectores ambientes y genotipos en direcciones opuestas indican interacción negativa, resultando ambientes desfavorables para esos genotipos (Gauch y Zobel, 1996; Gauch, 2006).

El modelo SREG (GGA *biplot*) (Cornelius *et al.*, 1996; Gauch y Zobel, 1997) es:

$Y_{ij} = \mu + \delta_j + \sum_k \lambda_k \gamma_{jk} + \epsilon_{ij}$, donde:

Y_{ij} = rendimiento del genotipo i en el ambiente j ;

μ = media general;

δ_j = efecto del sitio;

λ_k = valor propio del eje k de componentes principales;

γ_{jk} = los vectores propios unitarios ambientales asociados a λ_k ;

ϵ_{ij} = son los vectores propios unitarios genotípicos asociados a λ_k , y

ϵ_{ij} = error del genotipo i en el ambiente j .

El modelo SREG adiciona los efectos lineales de genotipos al término multiplicativo de la IGA. Los gráficos GGA *biplots* permiten visualizar los patrones de comportamiento de los genotipos más la interacción GA y, basándose en el análisis de componentes principales, muestran gráficamente cual de los genotipos tiene mejor comportamiento en cada localidad. Las representaciones gráficas ubican a los genotipos menos sensibles a las variaciones ambientales cerca del origen (Yan *et al.*, 2000; Yan, 2001).

Los datos se procesaron con el software estadístico Info-Gen (Balzarini *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio general de los genotipos para la producción de materia seca acumulada fue de $3.188 \pm 193,6 \text{ kg ha}^{-1}$, con rango de variación entre 2.949 y 3.601 kg ha^{-1} (Tabla 1). Los rendimientos promedio de triticales y tricepiros fueron $3.161 \pm 177,6$ y $3.230 \pm 220,4 \text{ kg ha}^{-1}$ respectivamente, con diferencia estadística no significativa entre ambos ($t = -0,82$ ns). Las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0,01$) tanto para los efectos principales G ($F = 2,1$), A ($F = 150,9$) como para la IGA ($F = 3,3$), con coeficiente de variación 22,4 %.

Análisis mediante la regresión

Los valores de rendimiento de materia seca promedio, coeficiente de regresión y sus desvíos se resumen en la Tabla 1 mientras que en las Figuras 1 y 2 se grafican los mismos considerando en ambos casos una banda de confianza de un desvío estándar. El rango de valores de b_i resultó amplio (0,86 - 1,33) pero con diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0,01$) sólo para dos de los 23 genotipos analizados, lo que indica que la respuesta de la mayoría a los cambios ambientales se ajusta al modelo de regresión lineal.

Las líneas de triticale 8 (C95/68), 7 (C95/46), 9 (C95/88), 2 (C49/510) y 1 (C94/404), en ese orden, mostraron rendimientos de materia seca acumulada superiores a la media general (Figura 1) y sus coeficientes de regresión se ubicaron dentro del intervalo de confianza. Además, resultaron de estabilidad altamente pronosticable dado que los desvíos de la regresión no difieren significativamente de cero (Figura 2). Dentro de ese grupo, sobresalieron la entrada 8 (C95/68) y 7 (C95/46) por su rendimiento de 3.526 y 3.435 kg ha^{-1} .

Respecto a los tricepiros, la línea 22 (TCP LP 116), la de mayor rendimiento (3.601 kg ha^{-1}), resultó estable y recomendable para ambientes de alta calidad agronómica debido a que tuvo coeficiente de regresión significativamente mayor que 1 y desvíos no significativos. La entrada 23, una reselección del material original de Covas (1976) denominada 3/40-50, también presentó alto rendimiento y adaptable a ambientes de alta calidad; sin embargo, el análisis la ubica fuera de la banda de confianza de los desvíos de la regresión, por lo que se comporta en forma inestable. Las entradas 20, correspondiente al cv. Don René INTA y las líneas experimentales 18 (TCP LP 114), 16 (LF 65 x Horovitz/4) y 21 (TCP LP 115) tuvieron rendimiento superior al promedio el rendimiento y comportamiento estable.

Los métodos para analizar la IGA y la estabilidad tienen ventajas y desventajas. La regresión (Eberhart y Russell, 1966) conjuga el empleo del coeficiente de regresión lineal b_i , que estima adaptabilidad, con los desvíos S^2d_i de la regresión, indicadores de estabilidad. Por ello resulta agronómicamente muy útil, es de sencilla interpretación y fue el método más empleado en diferentes cultivos y ambientes durante varias décadas (Flores *et al.*, 1998).

La comparación de 22 métodos uni y multivariados para analizar la IGA en ensayos multi ambientales en haba (*Vicia faba* L.) y arveja (*Pisum sativum* L.) efectuada por Flores *et al.* (1998), incluyen este método en un grupo de métodos que sólo hacen énfasis en la estabilidad pero aclaran que ignoraron la pendiente de la regresión debido a que la heterogeneidad de los valores de b_i resultó no significativa, por lo cual sólo emplearon los desvíos S^2d_i .

Otro antecedente de empleo de la regresión refiere al análisis de la estabilidad del rendimiento en grano realizado en la región del Mármara, Turquía, que permitió elegir líneas por su estabilidad y buena adaptabilidad a todos los ambientes empleados (Dogan *et al.*, 2011).

El método tiene, sin embargo, varias objeciones estadísticas. Entre ellas se señala que los índices ambientales no son independientes de los genotipos probados dado que se obtienen a partir de los propios datos. Esto implica una dependencia entre el índice ambiental y la productividad media de cada genotipo cuya estabilidad se quiere determinar; de este modo, no respeta el principio de independencia de las variables. Además, la estabilidad de un determinado genotipo depende del comportamiento del grupo de genotipos con el que esté comparado y también pueden ocurrir errores al estimar la media ambiental y falta

de homogeneidad de la variancia del error entre ambientes (Becker y León, 1988).

Análisis por índice P_i de Lin y Binns

La calificación del material en prueba se basa en los valores del índice P_i , que permite analizar la contribución de cada genotipo a la suma de cuadrados de la IGA en todos los ambientes asociando mayor productividad con mayor estabilidad. El punto de corte para P_i fue 102,3 y para el CM (GA) 105,1. El ordenamiento de los genotipos de triticale reveló que las líneas de triticale 8 (C95/68) y 7 (C95/46) presentaron valores de P_i por debajo del punto de corte, resultando las de mayor adaptabilidad con rendimientos superiores a la media general (Tabla 2); mientras que, entre los tricepiros, la línea 22 (TCP 116) fue la de mejor adaptabilidad y rendimiento, coincidiendo parcialmente con la regresión.

Fuera del punto de corte pero con valores de P_i cercanos y buenos rendimientos se ordenan el triticale 9 (C95/88) y las líneas de tricepiro 16 (LF 65 x Horovitz/4), 21 (TCP LP 115) y 18 (TCP LP 114). Por otro lado, tomando en cuenta el CM (GA), todos los materiales estuvieron por debajo del punto de corte, salvo el tricepiro 15 (LF 65 x Horovitz/2). Esto último está indicando que el índice de superioridad P_i resultó poco eficaz para calificar los materiales. Al respecto, Flores *et al.* (1998) comparando 22 métodos uni y multivariados para analizar la IGA en ensayos multi ambientales de haba (*Vicia faba* L.) y arveja (*Pisum sativum* L.), concluyen que el índice P_i estuvo más relacionado con el rendimiento que con la estabilidad.

Análisis AMMI₂ (GA biplot)

Los dos primeros componentes principales del análisis AMMI₂ explicaron el 78,6 % de la variabilidad debida a la interacción GA (CP1 52,3 % y CP2 26,3 %) (Figura 3).

El ambiente SR 2010 tuvo una importante contribución positiva a la interacción (alto valor positivo en el CP1) y presenta mayor asociación con las selectas doble propósito 13 (reselección Genú HA), 5 (C95/8), 6 (C95/28) y 4 (C95/140). Los ambientes SR 2009 y RC 2009 contribuyeron negativamente a la interacción (valores negativos en CP1) y se asociaron positivamente con todas las líneas experimentales de tricepiro excepto Don René INTA (entrada 20). La contribución del ambiente RC 2010 es altamente significativa en el CP2 y se asocia a la línea 23 (TCP 3/40-50).

Por otro lado, de acuerdo al modelo de análisis, los

genotipos más estables y por lo tanto menos sensibles a la influencia ambiental son los que se encuentran cercanos al punto de origen; tal es el caso de la línea de triticale 8 (C95/68), también destacada en los análisis anteriores.

La representación gráfica simultánea de genotipos y ambientes facilita la interpretación de los resultados y los métodos que la utilizan son muy empleados en la actualidad. El análisis AMMI incluye efectos no lineales y revela un componente de interacción altamente significativo que tiene un claro sentido agronómico y no tiene requisitos de diseño experimentales específicos, a excepción de una estructura de datos de dos vías (Zobel *et al.*, 1988). Además, tiene la ventaja de la ausencia de correlaciones entre los componentes principales y permite observar las diferencias entre ambientes, el grado de interacción de los genotipos con el ambiente, la estabilidad y las adaptaciones específicas de algunos genotipos a determinados ambientes (Gauch y Zobel, 1996; Gauch, 2006).

Ánalisis efectuados en diversos cultivos sugieren la utilidad del método AMMI. Así, el análisis del rendimiento en ensayos de soja [(*Glycine max* (L.) Merr.] mediante AMMI reveló un gran componente de la IGA de claro significado agronómico (Zobel *et al.*, 1988), mientras que Moreno-González y Crossa (1998), buscando desarrollar nuevos modelos de análisis, emplearon ensayos de triticale granífero para comparar los resultados con los obtenidos con diferentes modelos AMMI, concluyendo que, dentro de los diferentes modelos de efectos principales aditivos y la interacción multiplicativa, el AMMI₂ como el aquí empleado, resultó el mejor predictor. Más recientemente, Namorato *et al.* (2009) concluyen que es más eficiente que la regresión para determinar la estabilidad en genotipos precoces de maíz (*Zea mays* L.), dado que explican mucho mayor proporción de la suma de cuadrados de la IGA. Por su parte, Rueda Puente *et al.* (2011) comprueban que AMMI fue muy eficaz para identificar variedades de alto rendimiento en grano de trigo (*Triticum aestivum* L.), aunque concluyen?verifican que no todos los caracteres pueden analizarse con ese modelo.

El método AMMI ha sido empleado en forma satisfactoria por Lozano del Río *et al.* (2009) para analizar la producción de materia seca por corte y acumulada de triticales forrajeros en 6 localidades del Norte de México durante 4 años. El material estuvo constituido por 20 líneas F₁₀ y dos cvs. del programa de cereales de la Universidad Autónoma Antonio Narro. El análisis por corte agrupó en forma eficiente a los genotipos por su producción y estabilidad según el hábito de crecimiento.

Análisis SREG (GGA biplot)

El modelo SREG aplicado a los valores del carácter en análisis generó el *biplot* de la Figura 4. Los dos primeros componentes principales explicaron el 76,6 % de la variabilidad debida a la interacción GA (CP1 49,1 % y CP2 27,5 %), valores similares a los obtenidos con AMMI.

Seis de los 10 ambientes, SR 2008, SR 2011, SR 2012, RC 2008, RC 2011 y RC 2012, se ubicaron cercanos al origen (0,0) indicando tener una baja participación en la contribución a la interacción GA o sea que resultaron ambientes no favorables para analizar la IGA. En el sector derecho superior se ubicó el ambiente SR 2009 como de alta participación en el modelo y las líneas de tricepiro 18 (TCP LP 114), 22 (TCP LP 116) y 21 (TCP LP 115) fueron las que tuvieron mayor respuesta en la producción de materia seca total en ese ambiente.

El ambiente RC 2009 se ubica en el sector derecho inferior con similar contribución al modelo, destacándose las líneas de triticale 14 (Quiñé RA) y los tricepiros 17 (Lasko x Horovitz/11) y 19 (TCP LP 117) en ese ambiente. En el sector izquierdo se ubica el ambiente SR 2010 con dos líneas experimentales asociadas: los triticales 13 (Genú HA) y 5 (C95/8). El genotipo 16 de tricepiro (LF 65 x Horovitz/4) tuvo alto rendimiento (alta puntuación en el CP1) y muy baja o nula interacción GA (puntuación cercana a 0 en el CP2) (Yan *et al.*, 2000).

El análisis efectuado por SREG sugiere, coincidiendo con los métodos anteriores, tener en cuenta como posibles de registrar a las entradas de triticale 8 (C95/68) y 7 (C95/46), ambas de origen CIMMYT y seleccionadas en Río Cuarto para doble propósito. La primera resultó la más apropiada para los ambientes considerados, dado que tiene el mayor rendimiento entre las líneas ubicadas dentro del rango de estabilidad, mientras que la segunda fue la más estable aunque con un rendimiento promedio de materia seca alrededor de 80 kg ha⁻¹ menor que la primera (Tabla 1).

Por otra parte, los tricepiros 18 (TCP LP 114), 21 (TCP LP 115) y 16 (LF 65 x Horovitz/4) con rendimientos superiores al promedio y medianamente estables, pueden tenerse en cuenta como progenitores en un programa de mejoramiento y registrarse para ampliar la oferta de cultivares, dado que Don René INTA es el único registrado en la Argentina y que, a pesar de la intensa selección, aún mantiene inestabilidad fenotípica (Ferreira *et al.*, 2007).

El empleo de los gráficos GGA *biplot* se consideran una herramienta visual muy útil para genetistas, agrónomos

y mejoradores (Yan y Kang, 2003) porque permiten determinar qué genotipo tiene el mejor comportamiento en un ambiente específico y a su vez identificar el ambiente más adecuado para determinado genotipo. El genotipo ideal resulta aquel con alta puntuación en el CP1, asociado a alto rendimiento, y puntuación cercana a 0 en el CP2 que revela buena estabilidad del material probado a través de los diferentes ambientes.

El empleo del modelo SREG y su representación gráfica GGA *biplot* también se emplea con frecuencia. El método permitió identificar claramente el genotipo de trigo más rendidor en cada año y ambiente (Yan *et al.*, 2000); Sabaghnia *et al.* (2008) identifican variedades de lenteja (*Lens culinaris* Medick) de alto rendimiento y amplia adaptación, y Lúquez *et al.* (2010) en soja y una gran diversidad de ambientes verifican que la IGA fue más importante que los genotipos para explicar las variaciones del rendimiento; además, en los dos últimos casos se verificó que la suma de la CP1 y CP2 explicaron 70 % o más de la variación total.

El modelo de regresión por sitio puede resultar muy útil cuando se conducen ensayos en una amplia región porque permite disminuir los ambientes de evaluación al dividirlos en subregiones relativamente homogéneas. Por lo tanto, se pueden ver los ambientes similares, los mejores genotipos adaptados para esos ambientes, la estabilidad que presentaron y recomendar variedades o genotipos para cada uno de ellos.

La utilización del modelo SREG resulta aconsejable cuando los sitios (o ambientes) constituyen la fuente de variación más importante en relación a la contribución de los genotipos y la IGA sobre la variabilidad total, situaciones comunes en la práctica (Balzarini *et al.*, 2005). Este método multivariado requiere mucha diversidad ambiental para que se manifiesten sus ventajas. Resulta muy probable que el número de localidades y años aquí considerados no haya permitido la expresión plena del potencial de esta herramienta de análisis.

Varios autores han comparado métodos para analizar la estabilidad. En el caso de triticale, Goyal *et al.* (2011) analizan biomasa total y otros caracteres de 27 introducciones origen CIMMYT, durante 3 años en dos localidades canadienses, empleando los métodos de la regresión y SREG. Los resultados fueron coincidentes entre la regresión de Finlay y Wilkinson y el modelo SREG al identificar una misma línea como la más estable y rendidora, mientras que por el método de Eberhart y Russel se identificó una línea diferente para los mismos atributos.

Los genotipos ensayados han sido seleccionados con objetivo de doble propósito para la alimentación animal, contemplando el aprovechamiento del recurso tanto para el consumo del pasto fresco o conservado como del grano para suministro directo o en raciones. Todos los tríticales han sido seleccionados en el ambiente Río Cuarto (Córdoba), en tanto que los tricepiros LP fueron seleccionados en el ambiente Santa Rosa (La Pampa), el cv. Don René en Anguil (La Pampa) y los restantes en Río Cuarto.

Gran parte de los estudios sobre producción de forraje efectuados en el país contienen resultados que constatan la presencia de IGA (Grassi *et al.*, 2008; 2009; 2011; Ferreira *et al.*, 2012). El efecto de la IGA altamente significativa pone de manifiesto la dificultad para detectar genotipos con rendimientos estables y predecir su comportamiento. Generalmente, los programas de mejoramiento se ejecutan en una localidad y luego se prueba la adaptación del material experimental a diferentes ambientes y, cuando se pretende seleccionar genotipos de amplia adaptación, se debe buscar aquellos de alto efecto G y fluctuaciones tan bajas como sea posible (baja IGA) que alteren lo mínimo posible el orden de mérito de los materiales (Flores *et al.*, 1998).

Triticales y tricepiros son altamente autógamas y, en general, se tiende a fundar las líneas experimentales y cultivares a partir de una línea pura definida por selección individual en F_7 o a partir de un número muy limitado de líneas puras. Sin embargo, debido a la condición de híbridos intergenéricos de escasa historia evolutiva, mantienen cierto grado de inestabilidad feno-genotípica. Esto puede deducirse de las entradas 13 y 14 derivadas de los cultivares Genú y Quiñé-UNRC y resulta mucho más evidente en el tricepido Don René INTA, fenotípicamente muy variable a partir del cual se han efectuado varias reselecciones (Grassi *et al.*, 2009).

Los resultados de la aplicación de los diferentes métodos de análisis fueron coincidentes en identificar la línea 8 de triticale (C95/68) como de alto rendimiento de forraje y con escasa IGA, mientras que el TCP 23 (TCP 3/40-50), de alta capacidad forrajera, resultó inestable. El triticale 7 (C95/46), de alto rendimiento y muy estable según método de la regresión e índice P_i , resulta ser de muy buen rinde en materia seca pero poco estable según AMMI y de alto rendimiento sólo en un ambiente específico según SREG.

Respecto a las líneas experimentales de tricepido, las entradas 16 (LF65 x Horovitz/4), 18 (LP 114), 20 (D. René INTA), 21 (LP 115) y 22 (LP 116) resultaron estables según Eberhart y Russel y de rendimiento superior a la media, el AMMI las califica como variables, mientras que el SREG define a la entrada 16 como estable y de buen rendimiento, a la 21 como de mediana interacción GA y rendimiento superior pero muy cercano a la media, mientras que las líneas 18 y 22 resultan más rendidoras pero poco estables. El índice P_i sólo es coincidente en calificar como de alta adaptabilidad a la línea 22 de tricepido.

A modo de conclusión general, los resultados de la aplicación de los diferentes métodos son parcialmente coincidentes, en particular entre regresión y SREG, pero ninguno por sí solo debería tomarse como un indicador totalmente confiable para la toma de decisiones referente a recomendaciones de líneas a registrar como futuros cultivares para ambientes específicos. Sin embargo, resultan herramientas muy útiles para orientar las evaluaciones multiambientales imprescindibles cuando termina el proceso de selección en programas de fitomejoramiento. Los análisis permitieron identificar dos líneas de triticale y una de tricepido para su registro como cultivares.

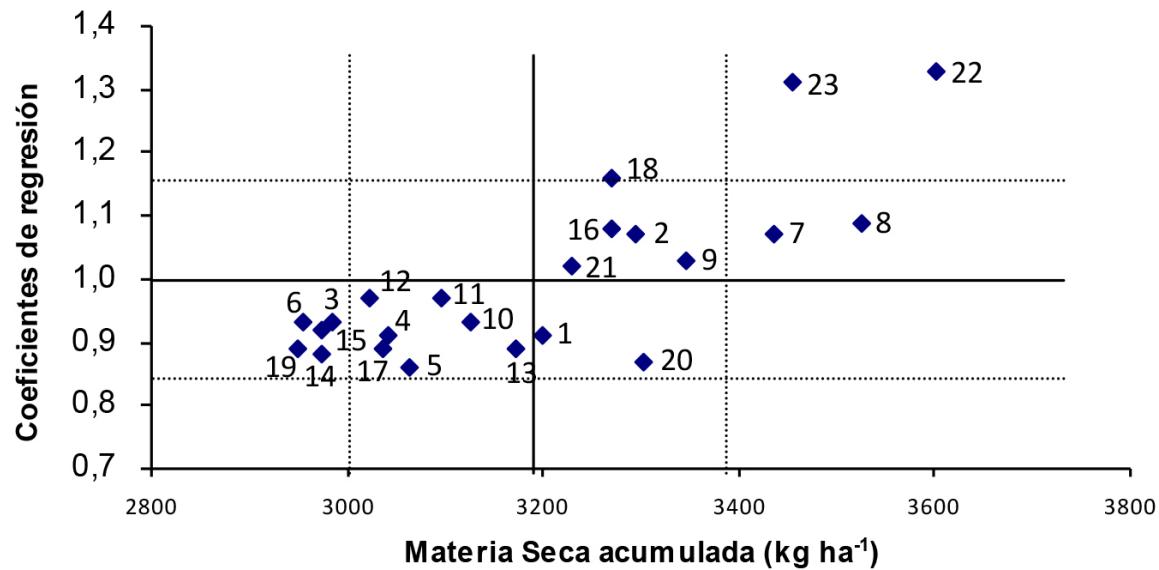


Figura 1. Relación: coeficientes de la regresión vs. rendimiento promedio de Materia Seca acumulada de 23 genotipos de tríticales y tricepiros en Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina, durante 2008-2012, con una banda de confianza de un desvío estándar según modelo de Eberhart-Russell (1966).

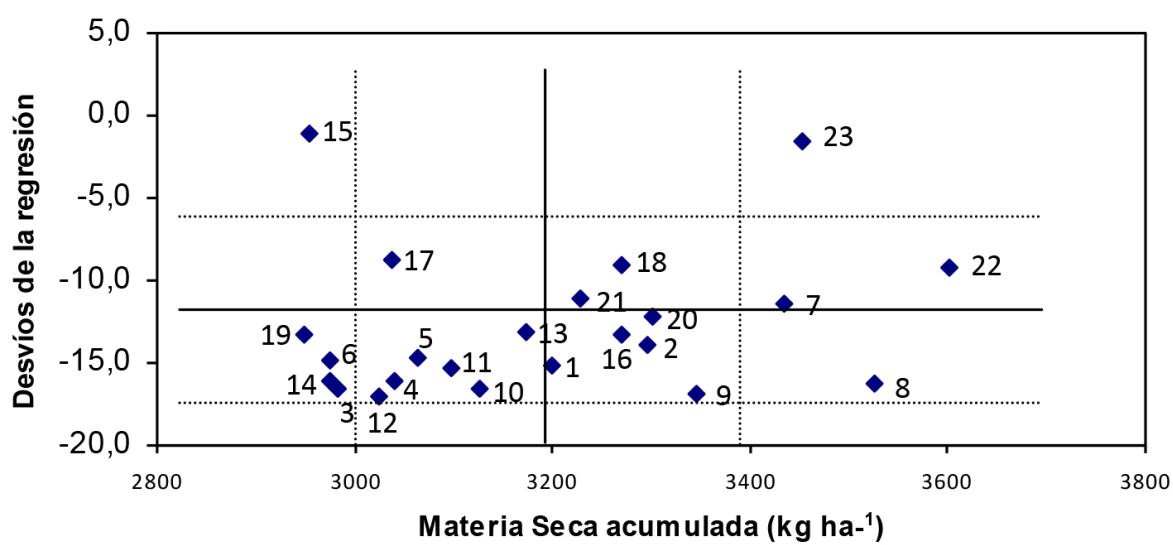


Figura 2. Relación: desviaciones de la regresión vs. rendimiento promedio de Materia Seca acumulada de 23 genotipos de tríticales y tricepiros en Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina, durante 2008-2012 con una banda de confianza de un desvío estándar según modelo de Eberhart-Russell (1966).

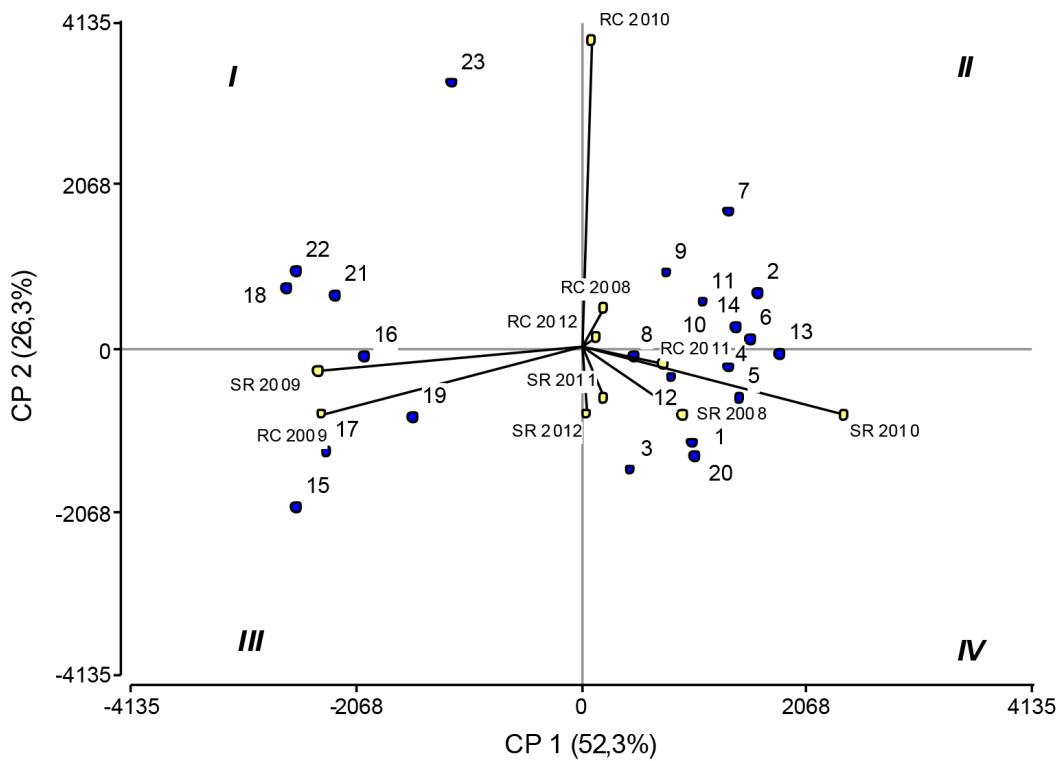


Figura 3. Producción acumulada de Materia Seca. Biplot del modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (AMMI2) para 23 genotipos de triticales y tricepiros evaluados en 10 ambientes de Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina.

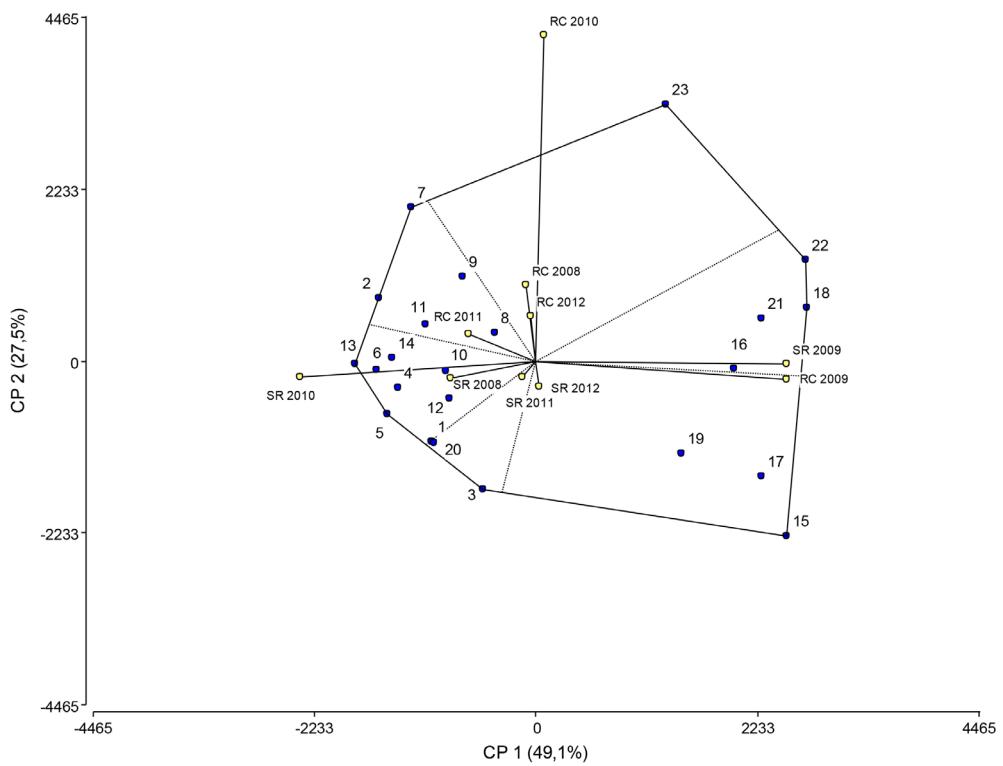


Figura 4. GGA biplot para la identificación de los mejores genotipos de triticales y tricepiros conducidos en las localidades de Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina, durante el período 2008-2012 para la Materia Seca acumulada. Puntos oscuros representan genotipos y puntos claros sitios.

Tabla 1. Parámetros de estabilidad en la Materia Seca acumulada de tríticales y tricepiros en Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina, durante el período 2008 a 2012 de acuerdo a la metodología de Eberhart y Russell (1966). Genotipos ordenados por rendimiento.

Genotipo	Género	Procedencia	Rendimiento Promedio (kg ha ⁻¹)	bi (coeficiente de regresión)	S ² d _i (desvíos de la regresión)
22 TCP LP 116	TCP	UNLPam (Argentina)	3.601	a	1,33 * -9,18 ns
8 C95/68	TC	CIMMYT (México)	3.526	ab	1,09 ns -16,30 ns
23 TCP 3/40-50	TCP	UNRC (Argentina)	3.454	abc	1,31 * -1,57 *
7 C95/46	TC	CIMMYT (México)	3.435	abc	1,07 ns -11,40 ns
9 C95/88	TC	CIMMYT (México)	3.345	abcd	1,03 ns -16,80 ns
20 Don René INTA	TCP	UNLPam (Argentina)	3.302	abcde	0,87 ns -12,20 ns
2 C94/510	TC	CIMMYT (México)	3.295	abcde	1,07 ns -13,90 ns
16 LF 65 x Horovitz/4	TCP	UNRC (Argentina)	3.271	abcde	1,08 ns -13,30 ns
18 TCP LP 114	TCP	UNLPam (Argentina)	3.271	abcde	1,16 ns -9,10 ns
21 TCP LP 115	TCP	UNLPam (Argentina)	3.228	bcd e	1,02 ns -11,10 ns
1 C94/404	TC	CIMMYT (México)	3.199	bcd e	0,91 ns -15,10 ns
13 Genú HA	TC	UNRC (Argentina)	3.173	bcd e	0,89 ns -13,20 ns
10 Genú UNRC	TC	UNRC (Argentina)	3.127	cde	0,93 ns -16,60 ns
11 Tizné UNRC	TC	UNRC (Argentina)	3.097	cde	0,97 ns -15,30 ns
5 C95/8	TC	CIMMYT (México)	3.064	cde	0,86 ns -14,70 ns
4 C95/140	TC	CIMMYT (México)	3.041	de	0,91 ns -16,10 ns
17 Lasko x Horovitz/11	TCP	UNRC (Argentina)	3.037	de	0,89 ns -8,70 ns
12 Yagán INTA	TC	INTA (Argentina)	3.024	de	0,97 ns -17,00 ns
3 C94/528	TC	CIMMYT (México)	2.984	de	0,93 ns -16,50 ns
6 C95/28	TC	CIMMYT (México)	2.975	e	0,92 ns -14,80 ns
14 Quiñé RA	TC	UNRC (Argentina)	2.975	e	0,88 ns -16,10 ns
15 LF 65 x Horovitz/2	TCP	UNRC (Argentina)	2.954	e	0,93 ns -1,17 *
19 TCP LP 117	TCP	UNLPam (Argentina)	2.949	e	0,89 ns -13,30 ns
Promedio general			3.188 ± 193,6	1,0 ± 0,1	-12,8 ± 4,4
Promedio Tríticales			3.161 ± 177,6		
Promedio Tricepiros			3.230 ± 220,4		

Tabla 2. Parámetros de estabilidad en la Materia Seca acumulada de triticales y tricepiros en Río Cuarto (Córdoba) y Santa Rosa (La Pampa), Argentina, durante el período 2008 a 2012 de acuerdo a la metodología de Eberhart y Russell (1966). Genotipos ordenados por rendimiento.

	Genotipo	Rendimiento Promedio (kg ha⁻¹)	Pi 10000	CM(GA) 10000
8	C95/68	3.526,3	ab	92,6
22	TCP 116	3.601,3	a	92,7
7	C95/46	3.435,4	abc	100,1
9	C95/88	3.345,1	abcd	108,9*
16	LF 65 X Horovitz/4	3.270,8	abcde	115,7*
21	TCP 115	3.227,6	bcde	117,0*
18	TCP LP 114	3.271,2	abcde	117,6*
23	TCP 3/40-50	3.453,7	abc	122,6*
20	Don René INTA	3.302,1	abcde	139,7*
2	C94/510	3.295,7	abcde	144,9*
11	Tizn�� UNRC	3.097,4	cde	149,3*
10	Gen�� UNRC	3.126,7	cde	157,5*
13	Gen�� HA	3.173,2	bcde	160,1*
12	Yag�� INTA	3.023,8	de	160,4*
1	C94/404	3.199,0	bcde	172,5*
14	Qui�� RA	2.975,2	e	173,6*
4	C95/140	3.041,4	de	182,7*
5	C95/8	3.063,7	cde	185,0*
17	Lasko x Horovitz/11	3.037,2	de	192,3*
19	TCP LP 117	2.949,2	e	193,3*
3	C94/528	2.984,6	de	202,8*
6	C95/28	2.957,7	e	218,9*
15	LF 65 X Horovitz/2	2.951,1	e	236,8*
				110,0*

BIBLIOGRAFÍA

- Arseniuk E. (2013) Triticale abiotic and biotic stresses- an overview. 8th Int. Triticale Symp. June, 10th-14th. Abstract Book: 37-38. ITA - Ghent University. Ghent, Belgium.
- Balzarini M., Bruno C., Arroyo A. (2005) Análisis de Ensayos Agrícolas Multiambientales. Ejemplos en Info-Gen. UN de Córdoba, Fac. de Cs. Agropecuarias. Estadística y Biometría. 1º Ed. 141 pp.
- Becker H.C., León J. (1988) Stability analysis in plant breeding. Plant Breed. 101 (1): 1-23.
- Castro N., Rufach H., Capellino F., Domínguez R., Paccapelo H. (2012) Evaluación del rendimiento de forraje y grano de triticales y tricepiros. Rev. Investig. Agrop. 37 (3): 281-289.
- Cornelius P., Crossa J., Seyedgard M.S. (1996) Statistical test and estimators of multiplicative models for genotype-by-environment interaction. In: Kang M.S., Gauch H.G. (Eds.) Genotyp-by-environment interaction. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 199-234.
- Covas G. (1976) Tricepiro, un nuevo verdeo sintético que involucra al trigo, centeno y agropiro. Informativo de Tec. Agropecuaria para la Reg. Semiárida Pampeana 68:5.
- (1989) Pampa semiárida: nuevos cultivos. Ciencia Hoy 1 (2): 75-77.
- Dogan R., Kacar O., Goksu E., Azkan N. (2011) Evaluation of triticale genotypes in terms of yield stability for the Southern Marmara region. Not. Bot. Horti. Agrobo. 39 (2): 249-253.
- Eberhart S.A., Russell W.A. (1966) Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci. 6 (1): 36-40.
- Ferrari M.R., Greizerstein E.J., Paccapelo H.A., Naranjo C.A., Cuadrado A., Jouve N., Poggio L. (2005) The genomic composition of Tricepiro, a synthetic forage crop. Genome 48 (1): 154-159.
- Ferreira V., Szpiniak B. (1994) Mejoramiento de triticale y tricepiro para forraje en la UN de Río Cuarto. En: Semillas Forrajeras, Producción y Mejoramiento: 110-120. Orientación Gráfica Eds., Buenos Aires.
- Ferreira V., Scaldafarro M., Grassi E., Szpiniak B. (2007) Nivel de ploidía, estabilidad citológica y fertilidad en cruzas de triticale x trigopiro (tricepiros). J. Basic Applied Genetics 18 (1): 15-22.
- Ferreira A., Castillo E., Paccapelo H., Ferreira V., Grassi E. (2012) Producción de forraje y estabilidad en líneas de tricepiro. Jornada Latinoamericana de Recursos Genéticos, Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. Pergamino, Buenos Aires, Argentina; Actas en CD, pp. 111.
- Ferreira, V., Paccapelo, H., Ferreira, A., Castillo, E. di Santo, H., Grassi, E. (2012) Tricepiro: rendimiento en grano y producción de biomasa de líneas avanzadas. XV Congreso Latinoamericano de Genética ALAG y XLI Congreso de la Sociedad Argentina de Genética. Rosario, Santa Fe, Argentina. JBAG 23 (Suppl.): 240-241.
- Finlay K.W., Wilkinson G.N. (1963) The analysis of adaptation in a plant breeding programme. Australian J. of Agric. Res. 14 (6): 742-754.
- Flores F., Moreno M.T., Cuberoc J.I. (1998) A comparison of univariate and multivariate methods to analyze GxE interaction. Field Crop. Res. 56 (3): 71-286.
- Fradkin M., Greizerstein E., Paccapelo H., Ferreira V., Grassi E., Poggio L., Ferrari M.R. (2009) Cytological analysis of hybrids between triticales and trigopiros. Genetics and Mol. Biology 32 (4): 797-801.
- Gauch H.G., Zobel R.W. (1996) AMMI analysis of yield trials. In: Kang M.S., Gauch H.G. (Eds.) Genotype-by-environments interactions. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 85-122.
- Gauch H.G., Zobel R.W. (1997) Identifying mega-environments and targeting genotypes. Crop Sci. 37 (2): 311-326.

- Gauch H.G. (2006) Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Sci.* 46 (4): 1488-1500.
- Goyal A., Beres B.L., Randhawa H.S., Navabi A., Salmon D.F., Eudes F. (2011) Yield stability analysis of broadly adaptive triticale germplasm in southern and central Alberta, Canada, for industrial end-use suitability. *Can. J. Plant Sci.* 91 (1): 125-135.
- Grassi E., Ferreira A., Castillo E., Ganum Gorri M.J., Ferreira V. (2008) Interacción genotipo-ambiente en siembras tempranas de triticale forrajero. VII Congreso Nacional de Trigo, V Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño Invernal. Santa Rosa, La Pampa; Actas sin paginar CD Sesión 7: S24, 5 pp.
- Grassi E., Ferreira A., Castillo E., Ferreira V. (2009) Forage Triticale: production and stability of strains in the sub humid central region of Argentina. Proceed. 7th International Triticale Symposium, Panel 132. México DF.
- Grassi E., Scaldaferro M., Reynoso L., Ferreira A., Castillo E., Ferreira V. (2011) Líneas de tricepiro: acumulación de materia seca, fertilidad y rendimiento de grano en Río Cuarto, Córdoba. *Rev. Argentina Prod. Animal* 31 (1): 1-16.
- INASE (2014) Instituto Nacional de Semillas, Catálogo de Cultivares. (<http://www.inase.gov.ar>, Acceso 21/09/2014).
- Kloster A.M., Bainotti C., Cazorla C., Amigone M.A., Donaire G., Baigorria T. (2013) Triticale: Un cultivo invernal plástico y multifuncional. Planteos Ganaderos SD. *Rev. Técnica Asoc. Argent. Productores en Siembra Directa*: 50-56.
- Lin C.S., Binns M.R. (1988) A superiority measure of cultivar performance for cultivar x location data. *Can. J. Plant Sci.* 68 (1): 193-198.
- Lozano del Río A.J., Zamora Villa V.M., Ibarra Jiménez L., Rodríguez Herrera S.A., de la Cruz Lázaro E., de la Rosa Ibarra M. (2009) Análisis de la interacción genotipo-ambiente mediante el modelo AMMI y potencial de producción de triticales forrajeros (X *Triticosecale* Wittm.). Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo 25 (1): 81-92.
- Lúquez J., Capurro M., Erazzú L. (2010) Genotype-environment interactions, megaenvironments and winner genotypes and environments for soybean grain yield in Argentina. *Rev. Fac. Agronomía, Univ. Nac. La Plata* 109 (1): 31-36.
- Mergoum M., Pfeiffer W.H., Peña R.J., Ammar K., Rajaram S. (2004) Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. In: Mergoum M., Gómez-Macpherson H. (Eds.) *Triticale improvement and production*. Plant Production and Protection Paper 179, FAO, Rome, Italy, pp. 11-26.
- Moreno-González, J., Crossa, J. (1998) Combining genotype, environment and attributes variables in regression models for predicting the cell-means of multi-environment cultivars trials. *Theor. Appl. Gen.* 96(6-7): 803-811.
- Myer R., Lozano del Río A.J. (2004) Triticale as animal feed. In: Mergoum M., Gómez-Macpherson H. (Eds.) *Triticale improvement and production*. Plant Production and Protection Paper 179, FAO, Rome, Italy, pp. 49-58.
- Namorato H., Vieira Miranda G., Vagno de Souza L., Rodrigues Olivera L., Oliveira De Lima R., Mantovani E.E. (2009) Comparing biplot multivariate analyses with Eberhart and Russell method for genotype x environment interaction. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 9 (3): 299-307.
- Peña R.J. (2004) Food uses in triticale. In: Mergoum M., Gómez-Macpherson H. (Eds.) *Triticale improvement and production*. Plant Production and Protection Paper 179, FAO, Rome, Italy, pp. 37-48.
- Rueda Puente E.O., Rodríguez R.E., Ponce F., Avendaño L., Santillano J., Cruz M. (2011) Interacción genotipo-ambiente para la estabilidad de rendimiento en trigo en la región de Mexicali, B.C., México. *Tropical and Subtr. Agroecos.* 14 (2): 543-558.

Sabaghnia N., Dehgani H., Sabahpour S.H. (2008) Graphic analysis of genotype by environment interaction for lentil yield in Iran. *Agron. J.* 100 (3): 760-764.

Tomaso J.C. (2008) Cereales Forrajeros de invierno: Producción de Materia Seca, Manejo del Cultivo, Curvas de Producción. INTA Bordenave. (<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/articulos/mejoramiento-genetico-de-cereales-forrajeros-t2107/p0.htm>. Acceso 20/08/14).

Tosso H., Paccapelo H.A., Covas G.F. (1997) Caracterización de líneas avanzadas de tricepiro. II Productividad de forraje, producción de grano y evaluación de componentes de rendimiento. *Rev. Investig. Agrop.* 28 (1): 47-54.

Tosso H., Paccapelo H.A., Covas G.F. (2000) Caracterización de líneas avanzadas de tricepiro. I. Descripción citológica. *Rev. Investig. Agrop.* 29 (1): 32-52.

Varughese G., Barker T., Saari E. (1987) *Triticale*. CIMMYT, México D.F. 32 pp.

Yan W., Hunt L., Sheng Q., Szlavnics Z. (2000) Cultivars evaluation and mega-environment investigation based on GGE Biplot. *Crop Sci.* 40 (3): 597-605.

Yan W. (2001) GGE Biplot- A windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. *Agron. J.* 93 (5): 1111-1118.

Yan W., Kang M.S. (2003) GGE Biplot analysis: a graphical tool for breeders, geneticists and agronomists. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.

Zobel R., Wright M., Gauch H. (1988) Statistical analysis of a yield trial. *Agron. J.* 80 (3): 388-393.

AGRADECIMIENTO

Financiación: SECyT-UN Río Cuarto 18/A208, 18/A255, 18/A312 y UN La Pampa 034/08 y 329/12.

SCREENING OF SOYBEAN CULTIVARS FOR CHLORIDE TOLERANCE IN ARGENTINA

TAMIZADO DE CULTIVARES DE SOJA POR TOLERANCIA A CLORUROS EN ARGENTINA

Lúquez J.E.^{1*}, Briguglio M.A.¹, Irigoyen F.¹, Eyherabide G.A.¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

* Author for correspondence
luquez.julia@inta.gob.ar

ABSTRACT

Soybean *Glycine max* [L. (Merrill)] is the most important crop in Argentina, where soil salinization is increasing. Development of salt tolerant cultivars is an effective approach to expand the crop area and minimize yield loss in saline soils. The aim of this work was to screen commercial soybean cultivars for chloride tolerance in three experiments. In the first experiment 37 cultivars were placed in paper rolls wetted with 50 mM NaCl. Germination speed and hypocotyl and radicle length were registered. Twelve cultivars were chloride tolerant as suggested by their hypocotyl and radicle length. In the second experiment, seven cultivars were grown under greenhouse conditions in containers with sandy soil, nutrients and 50 mM NaCl solution. Leaf scorch (LS) and leaves chloride content (LCC) were determined. Variability among cultivars was determined for both characteristics. In the third experiment, 13 cultivars were placed in paper rolls wetted with 100mM NaCl. Germination speed, hypocotyl and radicle length, and fresh plant weight were measured. Five cultivars were chloride tolerant as suggested by their fresh plant weight. Although 100 mM NaCl was the most restrictive treatment for seed germination, common chloride tolerant soybean cultivars were found in the three experiments. Therefore, genetic improvement for soybean chloride tolerance can be promising in Argentina.

Key words: soybean, chloride tolerance, germination, screening, variability, *Glycine max* [L. (Merrill)].

RESUMEN

La soja *Glycine max* [L. (Merrill)] es el cultivo más importante en Argentina, donde está aumentando la salinización del suelo. El desarrollo de cultivares tolerantes a la salinidad es una forma efectiva de expandir el área de cultivo y minimizar la pérdida de rendimiento en suelos salinos. El objetivo de este trabajo fue probar la tolerancia de distintos cultivares de soja al ion cloruro en tres experimentos. En el primer experimento se utilizaron semillas de 37 cultivares, colocándolas en toallas de papel enrolladas y embebidas en una solución de 50 mM de NaCl. Se registraron velocidad de germinación y largo de raíz e hipocótil. Según estas dos últimas variables, 12 cultivares resultaron tolerantes. En el segundo experimento se utilizaron siete cultivares y se dejaron crecer en invernáculo en macetas con suelo arenoso, regado con solución nutritiva y 50 mM de NaCl. Se determinaron índice de acoramiento (IA) y el contenido de cloruros en hoja (CCH). Fue posible detectar variabilidad entre cultivares para las dos características. En el tercer experimento se colocaron a germinar semillas de 13 cultivares en toallas de papel enrolladas y embebidas en una solución salina de 100 mM de NaCl. Se determinaron velocidad de germinación, largo de raíz e hipocótil y peso fresco de las plantas, detectándose cinco cultivares tolerantes según su peso fresco. Se encontraron genotipos tolerantes comunes en los tres experimentos, por lo que el mejoramiento genético para tolerancia a los cloruros es promisorio en Argentina.

Palabras clave: soja, tolerancia a cloruros, germinación, variabilidad, *Glycine max* [L. (Merrill)].

Fecha de recepción: 22/02/2015
Fecha de aceptación de versión final: 10/07/2015

INTRODUCCIÓN

To achieve global food security by 2050, primary production must almost be doubled. Climate change continues and good arable land is becoming scarce. There are about 1000 million hectares of saline soils worldwide. Salt stress is reported to inhibit soybean germination and plant growth, nodulation, seed yield and it can also cause severe leaf chlorosis, leaf bleaching and leaf scorching by chloride accumulation in the leaf (Abel and Mackenzie, 1964; Wang and Shannon, 1999; Banzai *et al.*, 2002; Singleton and Bohlool, 1984; Parker *et al.*, 1983; Katerji *et al.*, 2003; Abel, 1969; Yang and Blanchard, 1993). Soybean is salt sensitive (Luo *et al.*, 2005). The threshold salinity for soybean is 5.0 dS m⁻¹ (Chinnusamy *et al.*, 2005). Salt tolerance is thought to be primarily related to the ability of plants to limit accumulation of Na⁺ and Cl⁻ in leaves by exclusion (Abel, 1969; Lauchli and Wienecke, 1979; Essa, 2002). Genotypic tolerance of the chloride excluders to the acutely toxic effects of chloride *per se*, is based on visual leaf-scorching ratings and/or reduced chloride levels in the leaf (Parker *et al.*, 1983; Shao *et al.*, 1995; Yang and Blanchard, 1993). Substantial genetic variation exists for chloride tolerance among cultivars, breeding lines, some accessions of the wild progenitor of soybean (*G. soja* Sieb abd Zucc) and among the more distantly related perennial accessions (Li *et al.*, 2000; Pantalone *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999).

In Argentina, the third country in the world with soils affected by salinity after Russia and Australia, 19 million ha are cultivated with soybean, which is the major crop in the country. Soybean is cultivated throughout the country, from N to S, and soils affected by salinity include those in arid and semiarid environments with and without irrigation and those soils in humid environments (Lavado, 2007). Development of salt tolerant cultivars may substantially expand the land's food producing area. Information on plant response to varying salinity levels is important to recommend tolerant cultivars as parents in breeding programs. The objective of this study was to screen Argentinian commercial soybean cultivars for chloride tolerance under varying salinity levels.

MATERIALS AND METHODS

Experiments, cultivars and experimental design

Three experiments were conducted, two in growth chambers and one in a greenhouse at the Unidad Integrada Balcarce, located at 38° S and 58° W, in Argentina.

The first experiment was carried out in 2010 in a growth chamber (25° C, 16/8 h light/dark photoperiod, irradiance of 1300 lux). Thirty seven soybean commercial cultivars (cv) (listed in Table 1) were randomly selected for the trial; twenty seeds of each cv were placed in rolls of germination paper wetted with 50 mM commercial NaCl. This concentration was used because the responses of the different cultivars were unknown and we wanted to make sure that germination occurred. A control with distilled water (0mM) was used. A randomized complete block design replicated five times with blocking in time (every 14 days) was utilized. Germination speed, hypocotyl and radicle length were determined.

The second experiment was carried out in greenhouse and it was started on August 14th, 2011. Seven commercial soybean cultivars (listed in Table 2) were selected. Seeds from certain cultivars included in the first experiment were unavailable. The new seed included though, are widely distributed in the southeast of Buenos Aires and they belong to the same maturity groups (III and IV) used in this region. Three cultivars which were salt tolerant when exposed to 50 mM NaCl concentration as suggested by hypocotyl length (NA 4413), or by radicle and hypocotyl length (NA 3520) (experiment 1) were included in this experiment. Five seeds from each cv were planted in 8.7 cm tall plastic cones filled with 150 g of a sandy soil with nutrients (according to PC method by Lee *et al.*, 2008) in two replications (one seed per cone). Cones were placed in plastic trays filled with 20 l tap water to keep plant moisture. A 50 mM of NaCl salt solution was added to the plastic trays at the V2 to V3 seedling stage (Fehr and Caviness, 1977), and it was refilled with water and nutrients so that the trays water content of the trays reached one third of the height of the cones. Electrical conductivity (EC) was monitored daily with a Mettler Toledo MC226 Model with temperature probe conductivity meter. EC was 0.6 mS cm⁻¹ and 6.6 mS cm⁻¹ for the 0mM and 50 mM, respectively. Greenhouse temperature was recorded daily every 15 min. In Figure 1, daily average temperatures are presented from the beginning of the salt treatment until day number 11 of salt treatment. The experimental design was split plot, where NaCl level was the whole plot treatment and each cultivar (as a group of five seedlings) was randomized within the whole plot. Chloride content was measured with an Orion chloride ion selective electrode (ISE), 14 days after the initial NaCl treatment (when seedlings were harvested) (Pantalone *et al.*, 1997), and leaf scorching was determined according to Lee *et al.* (2008).

Once the first trial had been conducted, we were able to

see that the different cultivars responded to 50 mM NaCl. So, we decided to increase the salinity level because in Argentina soils can even be more saline. The third experiment was carried out in 2012 in a growth chamber (25° C, 16/8 h light/dark photoperiod, irradiance of 1300 lux). Thirteen soybean commercial cultivars (listed in Table 3) were selected for the trial; twenty seeds of each cv were placed in rolls of germination paper wetted with 100 mM commercial NaCl. A control with distilled water (0mM) was used. Cultivars which were salt tolerant as suggested by hypocotyl length

(NA 4413 and NA 3933) and radicle and hypocotyl length (A 3302 RG and NA 3731) in the first experiment in 2010, were included in this trial and some cultivars belonging to the second experiment (DM 4250, NA 4413, NA 4990, DM 4210 and NA 4613), too. There are new seeds because some of the varieties used in the previous experiments were unavailable. Germination speed, hypocotyl and radicle length and plant fresh weight were determined. A randomized complete block design replicated three times with blocking in time (every 14 days) was utilized.

Table 1. Radicle and hypocotyl length in 37 Argentinian soybean cultivars exposed to 50 mM NaCl salt concentration as compared to the control.

Cultivar	Radicle lenght (cm)			Hypocotyl length (mm)			Cultivar	Radicle lenght (cm)			Hypocotyl length (mm)		
	0mM	50mM	SDE ¹ (%)	0mM	50mM	SDE (%)		0mM	50mM	SDE (%)	0mM	50mM	SDE (%)
A 3289	10.16 ^a	7.09 ^b	30.20	2.65 ^a	2.20 ^a	16.90	NA 3933	17.52 ^a	12.92 ^b	26.2	2.95 ^a	2.93 ^a	0.67
A 3302 RG	6.36 ^a	7.33 ^a	15.00	3.23 ^a	2.59 ^a	19.80	NA 4209	11.56 ^a	12.07 ^a	0.44	4.00 ^a	3.65 ^a	8.75
ACA 360	13.63 ^a	9.32 ^b	31.60	3.83 ^a	3.51 ^a	8.30	NA 4413	14.63 ^a	7.22 ^b	50.6	4.01 ^a	3.32 ^a	17.20
ALM 3530	6.63 ^a	7.90 ^a	19.00	2.13 ^a	2.88 ^a	35.00	NA 4553	13.35 ^a	7.05 ^b	47.0	2.76 ^a	2.26 ^a	18.10
ALM 4200	11.38 ^a	12.7 ^a	11.50	2.61 ^a	2.33 ^a	10.70	NK 3200	11.11 ^a	8.52 ^b	23.3	2.08 ^a	1.91 ^a	8.10
ALM 4930	13.77 ^a	9.11 ^b	33.80	2.71 ^a	2.29 ^a	15.40	NK 3500	12.09 ^a	6.98 ^b	42.2	4.57 ^a	2.51 ^b	2.06
ARECO4330	11.07 ^a	7.86 ^a	29.00	2.62 ^a	1.81 ^a	30.90	NS 4903	6.80 ^a	6.37 ^a	6.30	3.37 ^a	2.12 ^b	37.10
AS 4201	13.74 ^a	8.30 ^b	39.60	2.66 ^a	3.54 ^a	33.00	RM 039	7.82 ^a	8.14 ^a	4.09	3.10 ^a	2.14 ^b	30.90
AS 4810	14.26 ^a	7.57 ^b	46.90	2.32 ^a	2.27 ^a	4.00	RM 048	13.66 ^a	5.88 ^b	56.9	2.81 ^a	2.28 ^a	18.80
Champaquí	11.19 ^a	7.70 ^b	31.30	2.09 ^a	2.01 ^a	3.80	SP 4500	16.29 ^a	9.89 ^b	39.3	4.46 ^a	3.33 ^b	25.30
DL 401 RG	7.69 ^a	9.59 ^a	24.70	3.76 ^a	2.09 ^b	44.40	SP 4X4	13.88 ^a	6.78 ^b	51.1	5.00 ^a	2.18 ^b	56.40
DM 3700	11.06 ^a	5.80 ^b	47.50	2.40 ^a	2.27 ^a	5.40	SPS 4X0	10.40 ^a	11.37 ^a	9.30	2.86 ^a	2.20 ^a	23.00
DM 4200	3.06 ^a	7.13 ^b	45.40	3.61 ^a	3.23 ^a	10.50	SRM 3402	12.43 ^a	14.50 ^a	16.6	3.14 ^a	2.69 ^a	14.30
DM 4670	11.96 ^a	5.50 ^b	54.00	4.09 ^a	2.76 ^b	32.50	SRM 4205	13.85 ^a	8.20 ^b	40.8	2.90 ^a	1.55 ^b	46.50
DM 4930	18.22 ^a	10.36 ^b	43.10	2.59 ^a	1.67 ^a	35.50	TJ 2049	10.85 ^a	8.16 ^b	24.8	1.07 ^a	1.62 ^a	51.40
FN 360	13.52 ^a	9.60 ^b	29.00	3.52 ^a	2.82 ^a	19.90	TJ 2136	7.61 ^a	8.76 ^a	15.0	3.41 ^a	2.60 ^a	23.70
FN 485	13.70 ^a	12.06 ^a	11.09	3.13 ^a	2.77 ^a	11.50	TJ 2139	11.41 ^a	11.42 ^a	0.01	3.10 ^a	2.69 ^a	13.20
NA3520 RG	7.34 ^a	7.04 ^a	4.00	2.44 ^a	2.19 ^a	10.20	TJ 2145	12.78 ^a	10.28 ^b	19.5	2.68 ^a	2.67 ^a	0.37
NA 3731	12.43 ^a	12.46 ^a	0.20	3.73 ^a	3.12 ^a	16.30							

Note: Means between columns (treatments) followed by the same letters are not significantly different at P=0.05.

¹SDE (%): salt detrimental effect: character value at 0mM NaCl minus character value at 50 mM NaCl/character value at 0mM NaCl * 100. In bold, negative SDE values

Table 2. Leaf chloride contents (g/kg^{-1}) (LCC) and leaf scorch score (LSS) in seven Argentinian soybean cultivars.

Cultivar	LCC	LSS
DM 4250	5.94 ^d	1
NA 3520	7.86 ^c	1
NA 4413	8.79 ^{bc}	2
NA 4990	10.37 ^b	2
DM 4210	11.86 ^b	2
RA 424	16.79 ^a	3
NA 4613	17.08 ^a	3

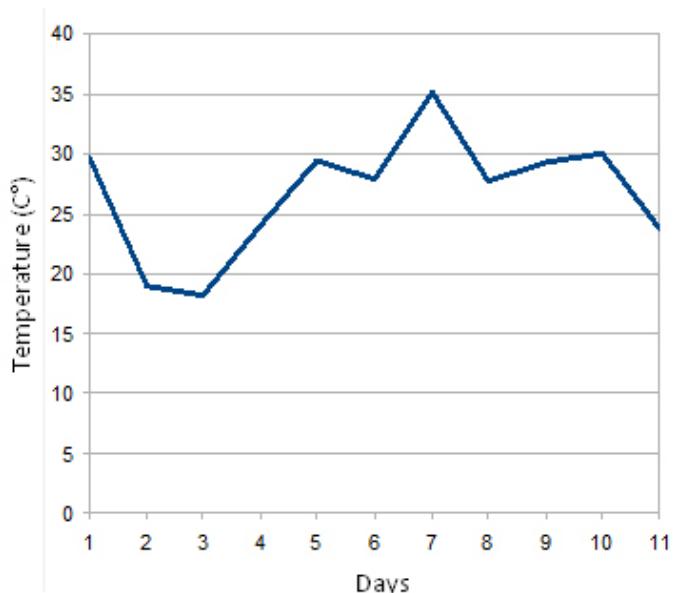


Figure 1. Average daily greenhouse temperatures ($^{\circ}\text{C}$) during 11 out of 14 days under salt treatment (50 mM NaCl) (experiment 2).

Data collection

First experiment

Germination speed was registered every 24 hours until full germination (Maguire, 1962), and hypocotyl and radicle length were measured at day 14 from the beginning of experiment (Yaver *et al.*, 2009). Each replication lasted 14 days.

For more details about germination speed, it was calculated by dividing the number of seedlings per 20 seeds obtained at each counting in the germination test by the number of days seeds have been in the germinator until full germination. The values obtained at each count are the sum at the end of the germination test in this way: (number of seedlings/days to first count + ... + number of seedlings/days to final count).

Second experiment

Salt injury was determined by a leaf scorch score (LSS). As no information was available regarding salt sensitivity of the cultivars used, leaf scorch ratings were made five days after the addition of salt solution, when the first plants (cultivar RA-424) exhibited salt injury or reached a leaf scorch of three (moderate chlorosis) according to Lee *et al.* (2008). Fourteen days after the initial NaCl treatment, single trifoliolate leaves, excluding the petiole, were taken and they were dried in a digital oven at 62° C for 24 hours. Dried leaves were ground using a mill and 0.15 g samples were in 30 ml of distilled water using an orbital shaker at 60 cycles min^{-1} for 1 h. The clear solution resulting after filtering the suspension through a filter

Table 3. Germination speed, radicle and hypocotyl length, and plant fresh weight of 13 Argentinian soybean cultivars exposed to 100 mM salt treatment as compared to the control.

Cultivar	GS			Radicle length (cm)			Hypocotyl length (mm)			Plant weight (g)		
	0mM	100mM	'SDE (%)	0mM	100mM	SDE (%)	0mM	100mM	SDE (%)	0mM	100mM	SDE (%)
DM 4210	15.60 ^a	9.93 ^b	36.3	17.75 ^a	10.43 ^v	41.2	4.51 ^a	2.53 ^v	43.9	9.52 ^v	10.79 ^a	13.3
DM 4670	16.33 ^a	10.10 ^v	38.1	17.36 ^a	13.88 ^v	20.0	4.86 ^a	3.02 ^v	37.8	10.49 ^v	11.28 ^a	7.50
NA 4413	14.29 ^a	9.95 ^b	30.3	17.84 ^a	11.05 ^b	38.0	4.59 ^a	3.05 ^b	33.5	9.31 ^a	9.96 ^a	6.90
NA 4990	15.66 ^a	11.72 ^b	25.1	20.29 ^a	11.79 ^b	41.9	5.09 ^a	3.30 ^b	35.1	10.4 ^a	9.65 ^b	4.30
DM 4250	16.00 ^a	9.63 ^v	39.8	18.11 ^a	11.75 ^v	35.1	4.60 ^a	3.00 ^v	34.8	9.92 ^v	10.93 ^a	10.0
NA 4613	13.61 ^a	9.93 ^b	27.0	18.70 ^a	11.40 ^b	39.0	4.55 ^a	3.58 ^b	21.3	9.62 ^b	11.00 ^a	14.0
NS 3521	14.83 ^a	11.62 ^b	21.6	19.59 ^a	14.35 ^b	26.7	4.84 ^a	2.62 ^b	45.9	10.61 ^a	10.76 ^a	1.40
DM 2200	14.37 ^a	8.59 ^v	40.2	18.86 ^a	10.68 ^v	43.3	5.22 ^a	3.03 ^v	41.9	9.95 ^a	9.67 ^a	3.40
DM 3810	14.83 ^a	8.39 ^b	43.4	15.54 ^a	11.39 ^b	26.7	3.99 ^a	2.05 ^b	48.6	11.23 ^a	10.67 ^b	5.00
DM 3070	13.19 ^a	8.83 ^b	33.0	18.03 ^a	13.52 ^b	25.0	4.40 ^a	2.41 ^b	45.2	10.20 ^b	11.44 ^a	12.0
A3302RG	14.60 ^a	7.91 ^b	45.8	18.06 ^a	10.47 ^b	42.0	4.84 ^a	2.29 ^b	52.7	10.60 ^a	10.64 ^a	0.37
NA 3731	17.66 ^a	12.30 ^b	30.3	21.25 ^a	15.26 ^b	28.2	4.72 ^a	3.32 ^b	29.7	9.07 ^b	9.70 ^a	6.90
NA 3933	15.25 ^a	11.05 ^v	27.5	19.73 ^a	14.79 ^v	25.0	5.19 ^a	3.06 ^v	41.0	9.52 ^a	9.26 ^a	2.70

Note: Means between columns (treatments) followed by the same letters are not significantly different at P=0.05.

'SDE (%): salt detrimental effect: character value at 0mMNaCl minus character value at 50 mMNaCl/character value at 0mMNaCl * 100. In bold, negative SDE values

paper was analyzed for chloride content using an ion selective electrode (Lee *et al.*, 2008). In ISE determinations, unknown samples are compared to solutions of known chloride concentrations. Known chloride concentration samples were prepared and the electrode potential was determined. A standard curve was established after this potential was graphed in accordance with the logarithm of chloride concentrations. The chloride concentration in the solution extracted from leaves samples was determined using the established standard curve.

Third experiment

Germination speed was registered every 24 hours until full

germination (Maguire, 1962), and hypocotyl and radicle length, and plant fresh weight were recorded at day 14 from the beginning of the experiment (Yaver *et al.*, 2009).

Statistical analysis

All experiments were analyzed separately using SAS (SAS Institute, 2004). An analysis of variance (ANOVA) was performed on each of the three experiments and the total variance was partitioned into salinity treatment and genotype effects including their interactions. Means were separated using Duncan's multiple range tests at 5 % probability level.

RESULTS

First experiment

Germination speed mean values ranged between 5.21 and 7.99 for cultivars RM 039 and AS 4201 for non-salt treatment, and 5.54 and 8.97 for cultivars SPS 4x0 and SRM 4205 for salt treatment. No significant differences among treatments ($P>0.05$) were found for this characteristic.

Means of hypocotyl and radicle length as well as salt detrimental effect (SDE, %) for all soybean cultivars in the experiment 1 and their significance among treatments are presented in Table 1. SDE was calculated as character value at 0 mM NaCl minus character value at 50 mM NaCl/character value at 0 mM NaCl * 100.

Hypocotyl length ranged between 1.07 and 5 mm for cultivars DM 4930 and DL 401 RG in non-salt treatment, and 1.55 and 3.65 mm for cultivars DM 4670 and A 3302 RG, respectively in salt treatment. The cv TJ 2049 presented the minor SDE (%) (-51.4) and the cv SPS 4 x 4, the major: 56.4. No significant differences ($P>0.05$) were found between treatments within 29 cultivars: A 3289, ACA 360, ALM 4930, AS 4201, AS 4810, Champaquí, DM 3700, DM 4200, DM 4930, FN 360, NA 3933, NA 4413 RG, NA 4553 RG, NK 3200, RM 048, TJ 2049, TJ 2145, A 3302 RG, ALM 3530, ALM 4200, ARECO 4330, FN 485, NA 3520 RG, NA 3731, NA 4209 RG, SPS 4 x 0, SRM 3402, TJ 2136 and TJ 2139.

Radicle length ranged between 5.50 and 14.50 cm for cultivars DM 4670 and SRM 3402 respectively in 50 mM salt concentration treatment as compared to the control (3.06 and 18.22 cm for cultivars DM 4200 RG and DM 4930 respectively). The cv DL 401 RG presented the minor value for SDE (24.7 %) and the cv RMO 48, the major value (56.9 %). Fungic contamination in some cultivars in the control probably decreased the plants radicle length. No significant interaction ($P>0.05$) was found between treatments and cultivars for 15 cultivars: A 3302 RG, ALM 3530, ALM 4200, Areco 4330, DL 401 RG, FN 485, NA 3520 RG, NA 3731, NA 4209 RG, NS 4903, RM 039, SPS 4 x 0, SRM 3402, TJ 2136 and TJ 2139.

No significant differences were found between treatments for either hypocotyl and radicle length within cvs A 3302 RG, ALM 3530, ALM 4200, ARECO 4330, FN 485, NA 3520 RG, NA 3731, NA 4209 RG, SPS 4 x 0, SRM 3402, TJ 2136 and TJ 2139.

Second experiment

Leaf chloride contents and LSS in the cultivars tested can be observed in Table 2. Leaf chloride contents and LSS ranged between 5.94 and 17.08 g/kg⁻¹ and 1 and 3 for cultivars DM 4250 and NA 4613, respectively, in the salt treatment. Those cultivars exhibiting low LSS also exhibited low chloride contents.

Significant variability for chloride sensitivity was observed among cultivars ($P<0.05$).

Non-significant differences in chloride content ($P>0.05$) were found between cvs RA 424 and NA 4613.

Third experiment

Germination speed mean values were 7.91 and 12.30 for cvs A 3302 RG and NA 3731 in the salt treatment, as compared to the control (13.19 and 17.66 for cvs DM 3070 and NA 3731, respectively). SDE (%) values ranged 21.6 for cv NS 3521 and 45.8 for cv A 3302 RG. Significant interaction ($P<0.05$) was found between cultivars and treatments for this characteristic.

Hypocotyl length mean values ranged between 2.05 and 3.58 mm for cultivars DM 3810 and NA 4613, respectively in salt treatment, and between 3.99 and 5.19 mm for cvs DM 3810 and NA 3933, respectively in non-salt treatment. The SDE (%) values ranged between 21.3 for cv NA 4613 and 52.7 for cv A 3302 RG. Significant interaction ($P<0.05$) was found between cultivars and treatments for this characteristic.

Radicle length mean values ranged between 10.43 and 15.26 cm for cultivars DM 4210 and NA 3731, respectively in the salt treatment, and between 15.54 and 21.25 cm for DM 3810 and NA 3731, respectively in non-salt treatment. The SDE (%) values ranged between 20 for cv DM 4670 and 43.3 for cv DM 2200. Significant interaction ($P<0.05$) was found between treatments and cultivars for this characteristic.

Plant fresh weight mean values were between 9.26 and 11.44 g for cultivars NA 3933 and DM 3070, respectively, in the salt treatment and between 9.07 and 11.23 g for cultivars NA 3731 and DM 3810 respectively, in non-salt treatment. The SDE (%) values ranged between 5 for cv DM 3810 and 14 for cv NA 4613. No significant interaction ($P>0.05$) was found between cultivars NA 4413, NS 3521, DM 2200, A 3302 RG and NA 3933 and the salt treatment.

DISCUSSION

Results found in the different experiments carried out, showed how salinity-induced stress by 50 and 100 mM concentration NaCl, mainly this last concentration, significantly affected speed germination, radicle and hypocotyl lengths and plant fresh weights. This demonstrate that such variables could be very useful for screening salt tolerance at early stages of plant development (Abel and Mackenzie, 1964; Alghamdi, 2009; Essa, 2002; Yaver *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Similar trends were observed under greenhouse conditions for the variables leaf chloride score and leaf chloride contents, when plants were exposed to 50 mM salt concentration. Cultivars exposed to salt treatment developed more high leaf scorch and higher chloride contents in their leaves than those in the control, which is in agreement with previous findings (Pantalone *et al.*, 1997; Lennis *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Results from this study confirm the chloride excluder condition of soybean, because of the significant variability in leaf chloride score and chloride content among cultivars. The ability of a genotype to germinate, to increase radicle and hypocotyl length and to increase its seedling weight under salt stress conditions does not necessarily indicate that the plant could withstand salt stress and complete its life cycle (Pearson and Berstein, 1959; Pearson *et al.*, 1966; Norlyn and Epstein, 1984). However, it is very important to know which the common salt tolerant cultivars are in the different experiments because different variables are measured at different development stages.

In this sense, we can say that 12 out 37 soybean cultivars included in our experiment resulted tolerant to salt stress as expressed by their radicle and hypocotyl lengths when exposed to 50 mM NaCl concentration. Some of the cultivars which were salt tolerant in experiment 1 as shown by hypocotyl length (NA 4413), and by radicle and hypocotyl length (NA 3520), were also included in the greenhouse experiment and showed the lowest LCC and LSS. No significant difference in the plant fresh weight was found in cultivar NA 4413 when exposed to 100 mM salt treatment, as compared to the control. Cultivars A 3302 RG, ALM 3530 and NA 3731 resulted salt tolerant as expressed by its radicle and hypocotyl length when exposed to 50 mM NaCl concentration, and it also resulted salt tolerant as expressed by the plant fresh weight when exposed to 100 mM NaCl concentration, in

comparison with the controls. In fact, as it can be observed by the variables germination speed, radicle and hypocotyl length, 100 mM NaCl concentration was more restrictive than 50 mM NaCl concentration for all common cultivars in experiments 1 and 3 (DM 4210, NA 4413, NA 4990, DM 4250 and NA 4613). However, cvs DM 4210, DM 4250 and NA 4413 didn't present SDE for fresh weight at 100 mM NaCl and had lower values of LCC and LSS in experiment 2 (50 mM NaCl).

CONCLUSIONS

Two prerequisites for the genetic improvement for salt tolerance include within-species (or cultivars) variability and the access to a reliable method for the screening of large numbers of genotypes. According to our results, it is possible to say that genetic improvement of soybeans for chloride tolerance through traits related with seed germination and other characteristics measured in young plants exposed to 50 mM NaCl concentration is feasible. This is possible since the screening methods used are reliable and that there is genetic variability among cultivars for the traits determined in these experiments in Argentina.

REFERENCES

- Abel G.H. (1969) Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans. *Crop Sci.* 9: 697-698.
- Abel G.H., Mackenzie A.J. (1964) Salt tolerance of soybean varieties (*Glycine max* L. Merrill) during germination and late growth. *Crop Sci.* 4: 157-161.
- Alghamdi S.S. (2009) Screening for salinity tolerant of soybean (*Glycine max* L.) using seed germination. In: Lijuan Q., Rongxia J., Jian J., (Eds.) World Soybean Conference Research VIII, 10-14 August 2009, Beijing, China; p. 84.
- Banzai T., Hershkovits G., Katcoff D.J., Hanagata N., Dubinsky Z., Karube I. (2002) Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Sci.* 162: 499-505.

- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J.K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45: 437-448.
- Essa T.A. (2002) Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. *Crop Sci.* 188: 86-93.
- Fehr W., Caviness C. (1977) Stages of soybean development. Ames, IA: Agriculture and Home Economics Experiment Station and Cooperative Extension Service. Iowa State University. Special Report 80; p. 11.
- Katerji N., Hoorn J.W., Hamdy A., Matrulli M. (2003) Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. *Agric. Water Management* 62: 37-66.
- Lauchli A., Wienecke J. (1979) Studies on growth and distribution of Na^+ , K^+ and Cl^- in soybean varieties differing in salt tolerance. *Zpflanz Bodenkd* 142: 3-13.
- Lavado R.S. (2007) Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. In: Taleisnik E., Grunberg K., Santa María G. (Eds.) *La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria*. First edition. Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina; p. 11-15.
- Lee J.D., Smothers S.L., Dunn D., Villagarcía M., Shumway C.R., Carter Jr. T.E., Shannon G. (2008) Evaluation of a simple method to screen soybean genotypes for salt tolerance. *Crop Sci.* 48: 2194-2200.
- Lennis J.M., Ellersieck M., Blevins D.G., Sleper D.A., Nguyen H.T., Dunn D.J., Lee D., Shannon J.G. (2011) Differences in ion accumulation and salt tolerance among *Glycine* accessions. *J. Agr Crop Sci.* 197: 302-310.
- Li Y.B., Hu Z.A., Wang H.X. (2000) Further study on genotypic variation of salt tolerance to wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.). *Soybean Genet Newslett* 27. <http://www.soygenetics.org/previewIssue.php?issueID=4&archive=1> (accesed September 2014).
- Luo Q., Yu B., Liu Y. (2005) Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *J. Plant Physiol.* 162: 1003-1012.
- Maguire J.D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177.
- Neves G.Y.S., Marchosi R., Ferrarese M.L.L., Siqueira-Soares R.C., Ferrarese-Filho O. (2010) Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Crop Sci.* 196: 467-473.
- Norlyn J.D., Epstein E. (1984) Variability in salt tolerance of four triticale lines at germination and emergence. *Crop Sci.* 24: 1090-1092.
- Pantalone V.R., Kenworthy W.J., Slauther L.H., James B.R. (1997) Chloride tolerance in soybean and perennial *Glycine* accessions. *Euphytica* 97: 235-239.
- Parker M.B., Gascho G.J., Gaines T.P. (1983) Chloride toxicity of soybeans grown on Atlantic coast flatwoods soils. *Agron. J.* 75: 439-443.
- Pearson G.A., Ayers A.D., Eberhard D.L. (1966) Relative salt tolerance of rice during germination and early seedling development. *Soil Sci.* 102: 151-156.
- Pearson G.A., Bernstein L. (1959) Salinity effect at several growth stages of rice. *Agron. J.* 51: 654-657.
- SAS Institute Inc. (2004) SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000-2004.
- Shao G.H., Chang R.H., Chen Y.W. (1995) Screening for salt tolerance to soybean cultivars of the United States. *Soybean Genet. Newslett.* 22: 32-42.
- Singleton P.W., Bohlool B.B. (1984) Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* 74: 72-76.
- Wang H., Hu Z., Zhong M., Lu W., Wei W., Yun R., Qian Y. (1997) Genetic differentiation and physiological adaptation of wild soybean populations under saline conditions: isozymatic and random amplified polymorphic DNA study. *Acta Botánica Sin.* 39: 34-42.
- Wang D., Shannon M.C. (1999) Emergence and seedling

growth of soybean cultivars and maturity groups under salinity. Plant Soil 214: 117-124.

Yang J., Blanchard R.W. (1993) Differentiating chloride susceptibility in soybean cultivars. Agron. J. 85: 880-885.

Yaver S., Pasa C., Onemli F., Atakisi I.K. (2009) Effect of NaCl on seed germination of five soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. In: Lijuan Q., Rongxia J., Jian J. (Eds.) World Soybean Research Conference VIII, August 2009, Beijing, China; p. 84.

Zhang Q., Wang H., Hu Z. (1999) RAPD markers associated with salt tolerance in wild soybean populations. Soybean Genet Newslett. 26. <http://www.soygenetics.org/previewIssue.php?issueID=4&archive=1> (accesed Sept. 2014).

Zhang X.K., Zhou Q.H., Cao J.H., Yu B.J. (2011) Differential Cl⁻/salt tolerance and NaCl-induced alternations of tissue and cellular ion fluxes in *Glycine max*, *Glycine soja* and their hybrid seedlings. Crop Sci. 197: 329-339.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof. Viviana Innocentini for the reading and editting of this work.

ASSOCIATION BETWEEN GENETIC AND PHENOTYPIC VARIABILITY WITH ADJUSTMENT FOR SPATIAL AUTOCORRELATION IN *Prosopis*

ASOCIACIÓN ENTRE VARIABILIDAD GENÉTICA Y FENOTÍPICA CON AJUSTE POR AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL EN *Prosopis*

Teich I.^{1*}, Mottura M.², Verga A.², Balzarini M.¹

¹ Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. CONICET.

² Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV). Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

* Author for correspondence
ingridteich@gmail.com

ABSTRACT

Association studies that relate phenotypic and genetic information allow the detection of relevant interactions. In these studies it is necessary to consider the effects of spatial structure in the data, which is very common in nature, particularly in plant species. *Prosopis chilensis* and *P. flexuosa* are two hardwood arboreal species with environmental and economic importance. Significant gene flow occurs between them with the production of natural and fertile hybrids. Given that morphological characters are used to classify individual trees, it is of interest to explore the association between the phenotypic variables used in the taxonomic classification and genetic variability. In this work, multivariate associations between genetic and morphological variability were explored in a *P. chilensis* and *P. flexuosa* hybrid swarm considering the possible spatial autocorrelation. For this purpose the molecular (six polymorphic microsatellite markers) and the morphological (13 traits) characterizations of 81 adult trees in a 4,700 m² plot in Córdoba, Argentina were used. The spatial structures of genetic and phenotypic variability were analyzed at a fine spatial scale. Both characterizations were associated through a Mantel approach based on the correlation of distance matrixes, as well as with new approaches that include the complementary use of multivariate analysis and mixed linear models. A significant genotype-phenotype association, relevant for the management of *Prosopis* genetic resources was detected. Even with a weak spatial structure, the inclusion of the spatial autocorrelation in the analyses improved the detection and modeling of the association between the observed genetic and phenotypic variability.

Key words: Spatial Statistics, Moran Index, Partial Mantel Test, Canonical Correlations, Generalized Procrustean Analysis

RESUMEN

Los estudios de asociación entre datos genéticos y fenotípicos permiten detectar interacciones relevantes. En estos análisis es necesario considerar los efectos de la estructura espacial de los datos, la cual es muy común en la naturaleza, particularmente en plantas. *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* son dos especies arbóreas de importancia económica y ambiental entre las cuales se produce flujo génico y se originan híbridos fértiles. Para la clasificación de estas especies se utilizan caracteres morfológicos, siendo de interés conocer y cuantificar la asociación entre la variabilidad fenotípica caracterizada mediante las variables usadas en la clasificación taxonómica, y la variabilidad genética. En este trabajo se exploran asociaciones multivariadas entre la variabilidad genética y morfológica de un enjambre híbrido entre *P. chilensis* y *P. flexuosa*, considerando la posible autocorrelación espacial en los datos. Para esto se utilizó la caracterización genética (seis marcadores microsatélites) y morfológica (13 caracteres) en 81 individuos adultos ubicados en una parcela de 4.700 m² en Córdoba, Argentina. Se analizó la estructura espacial de la variabilidad genética y morfológica a escala fina y se asociaron ambas caracterizaciones mediante una aproximación de Mantel basada en la correlación de matrices de distancias y nuevas aproximaciones que incluyen el uso complementario de análisis multivariados y modelos lineales mixtos. Se encontró significativa asociación genotipo-fenotipo, información relevante para el ordenamiento del recurso genético algarrobo. Aún con la débil estructura espacial en los datos, la incorporación de la autocorrelación espacial mejoró la capacidad de detección y modelación de la asociación entre la variabilidad genética y fenotípica observada en el enjambre híbrido.

Palabras clave: Estadística Espacial, Índice de Moran, Correlación Parcial de Mantel, Análisis de Correlaciones Canónicas, Análisis de Procrustes Generalizado.

Fecha de recepción: 16/07/2015
Fecha de aceptación de versión final: 22/09/2015

INTRODUCCIÓN

Los estudios de asociación entre datos obtenidos a nivel genético y provenientes de otros niveles de organización permiten detectar interacciones relevantes de los genotipos. El estudio de la asociación de información fenotípica y genotípica se realiza frecuentemente con procedimientos univariados (Brachi *et al.*, 2010; Cockram *et al.*, 2010), considerando cada característica de interés separadamente. Sin embargo, la reemergencia de aproximaciones holísticas y multivariadas en los últimos años ha generado un cambio de perspectiva en la biología (Carrari *et al.*, 2006), probablemente facilitado por importantes avances en el desarrollo de tecnologías e instrumental para la caracterización multidimensional de los distintos niveles de organización. Así, las ciencias “ómicas” como la fenómica y la genómica, tienen en común la búsqueda del estudio integral de los seres vivos, para lo cual las asociaciones de distintos tipos de datos es crucial (Houle *et al.*, 2010). Las técnicas estadísticas del análisis multivariado permiten abordar los estudios de asociación multidimensional entre diferentes tipos de datos (Jombart *et al.*, 2009; Balzarini *et al.*, 2011; Teich *et al.*, 2011). Sin embargo, aún cuando las técnicas multivariadas clásicas permiten operar sobre variables correlacionadas, suponen independencia (no correlación) entre las unidades de análisis. Una cuestión fundamental que debe considerarse en cualquier estudio de asociación es la existencia de estructuras de correlación en los datos. Cuando se lleva a cabo un análisis de asociación sin considerar los efectos de dependencia de los datos, se aumenta el riesgo de detectar asociaciones espurias tanto como el de no detectar asociaciones (Keitt *et al.*, 2002). En la naturaleza es frecuente que la variabilidad genética presente estructuras espaciales, particularmente en especies de plantas (Vekemans y Hardy, 2004). Los datos fenotípicos también pueden estar estructurados espacialmente.

Dos procedimientos multivariados diseñados para cuantificar asociaciones no restringidas espacialmente son el análisis de correlaciones canónicas (Hotelling, 1933) y el análisis denominado Procrustes Generalizado (Gower, 1975). A pesar de que no se trata de técnicas de desarrollo reciente, su aplicación en el contexto de datos biológicos masivos sí lo es (Bramardi *et al.*, 2005). No obstante, estos procedimientos de análisis de asociaciones multivariadas se basan en modelos lineales generales que suponen datos independientes, por lo que podrían producir resultados errados bajo autocorrelación espacial.

Entre las aproximaciones para estudiar asociaciones multivariadas con datos estructurados espacialmente, se encuentra la prueba de Mantel Parcial (Smouse *et al.*, 1986). El estadístico de la prueba Mantel Parcial correlaciona la información que existe en dos matrices controlando el sesgo que podrían introducir variaciones de otro conjunto de variables (tercera matriz). Por ejemplo, puede ser usado para correlacionar matrices de diferencias de datos genéticos y datos fenotípicos controlando por una matriz de distancias espaciales entre las unidades de análisis. Algunos autores sugieren que cuando se trabaja con datos correlacionados, las pruebas de Mantel, tanto simple como parcial, podrían producir un exceso de tasa de error tipo I cuya magnitud se incrementa con la intensidad de la autocorrelación espacial (Raufaste y Rousset, 2001; Teich, 2012; Guillot y Rousset, 2013). Otra aproximación al análisis de datos correlacionados espacialmente que se encuentra cada vez más difundida, se basa en el uso de modelos lineales mixtos (MLM) (Littell *et al.*, 2006). Los MLM han permitido integrar conceptos relativos a la estructura de correlaciones de cualquier tipo de datos normales en un marco analítico flexible y unificado. Si bien podrían aplicarse a variables sintéticas de distribución continua, como puede ser una componente principal o una variable canónica, su aplicación en el estudio de asociaciones de tipo multivariado es prácticamente nula.

Las especies del género *Prosopis* (Mimosoideae) constituyen un recurso natural con características de interés debido a sus adaptaciones para crecer en suelos pobres, donde pocas especies pueden sobrevivir (Pasiecznik *et al.*, 2001). En particular, *P. chilensis* y *P. flexuosa* son dos especies arbóreas de importancia económica y ambiental en nuestro país. La ocurrencia de flujo génico entre ambas y la producción de híbridos fértils en ambientes naturales, aunque disturbados por el hombre, genera fenotipos intermedios que dificultan la determinación taxonómica de las especies y los híbridos (Saidman *et al.*, 2000; Mottura, 2006). Con este fin, Verga (2000) confeccionó una clave basada en taxonomía numérica de caracteres morfológicos de hoja y fruto. Asimismo, se desarrolló un conjunto de marcadores moleculares microsatélites (SSR) específico para estas especies (Mottura *et al.*, 2005). Dado que los caracteres morfológicos presentan alta variabilidad con el ambiente, es de interés conocer y cuantificar la asociación entre la variabilidad fenotípica caracterizada mediante las variables usadas en la clasificación, y la variabilidad genética en una escala espacial fina. Cuando el análisis conjunto de

la información genética y morfológica sugiere la existencia de un consenso entre ambas caracterizaciones, y de la existencia de unidades biológicas diferenciadas dentro del complejo de híbridos, los procesos microevolutivos que dieron origen a estas unidades pueden ser estudiados más eficientemente, otorgando valor tanto adaptativo como diagnóstico a los caracteres estudiados. El objetivo de este trabajo es explorar asociaciones multivariadas entre la variabilidad genética y morfológica en un enjambre híbrido de *Prosopis* sp., evaluando la posible estructuración espacial de la variabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos

Se utilizó una base de datos correspondiente a la caracterización genética y morfológica de un enjambre híbrido de *P. flexuosa* y *P. chilensis* ubicado en una parcela de 4.700 m² en el Parque Provincial y Reserva Forestal Chancaní, en el Oeste de la provincia de Córdoba, Argentina (Mottura, 2006). En dicho trabajo se georreferenciaron bidimensionalmente y caracterizaron 100 individuos adultos mediante 6 SSR y 20 caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos medidos en 10 hojas y 5 frutos por individuo. Para los fines del presente trabajo se utilizaron sólo aquellos individuos en los cuales los datos faltantes no superaran el 50 % de los marcadores moleculares, resultando en un total de 81 individuos. Asimismo se utilizaron sólo caracteres morfológicos cuantitativos y no redundantes, resultando en 13 variables morfológicas. Los individuos fueron clasificados en *P. flexuosa*, *P. chilensis* e híbridos en base a la clasificación propuesta por Verga (2000). Del total de individuos, 8 fueron clasificados como híbridos, 63 como *P. flexuosa* y 10 como *P. chilensis*. A continuación se resumen algunas características relevantes de la biología y ecología de las especies de estudio así como la descripción de la caracterización genética y morfológica.

Especies de estudio

Prosopis chilensis (Molina) Stuntz y *P. flexuosa* DC. pertenecen a la sección Algarrobia del género *Prosopis*. Ambas son diploides con un número cromosómico 2n=28. Morfológicamente ambas especies se diferencian principalmente por el tamaño de las pinnas y los foliolos (más largos en *P. chilensis*), las espinas y los frutos. La polinización ocurre por medio de insectos, principalmente

abejas, y la dispersión de semillas es endozoocora. Ambas especies son nativas de América del Sur y en Argentina el rango de distribución natural de *P. chilensis* es más restringido que el de *P. flexuosa*, incluyendo las provincias fitogeográficas del Monte, el Espinal y el Chaco. Particularmente en la región del Chaco Árido ambas especies ocupan nichos ecológicos diferentes, debido a los mayores requerimiento de agua de *P. chilensis*. Sin embargo existen zonas de contacto entre ambas especies donde se registra la aparición de híbridos, particularmente en lugares disturbados por el hombre. La hibridación es común en la sección Algarrobia del género *Prosopis* (Hunziker *et al.*, 1986; Saidman, 1990; Vega y Hernández, 2005), en el cual existe una gran similitud genética entre las especies (Bessegá *et al.*, 2000; Saidman *et al.*, 2000). Estudios del sistema de apareamiento en el enjambre híbrido indican que el flujo génico entre los grupos es asimétrico y que la hibridación está acompañada por un proceso de introgresión (Mottura, 2006).

Caracteres morfológicos

Se utilizaron 13 caracteres morfológicos cuantitativos de hoja y fruto (Tabla 1), los cuales son utilizados para obtener grupos de individuos con características comunes en un grado de detalle mayor que el alcanzado mediante la sistemática clásica (Verga, 1995; 2000; Verga *et al.*, 2009). Si bien se seleccionaron aquellos caracteres menos redundantes existen altas correlaciones entre los mismos. Por ejemplo y como es de esperar el largo del foliolulo (LF) se encuentra altamente correlacionado con el área del foliolulo (AR), el área total de la hoja (AFOL), el largo de la pinna (LPI) y la relación largo-ancho del foliolulo. El único carácter que no se encuentra correlacionado con ningún otro rasgo es el falcado (FAL).

Caracteres moleculares

Los datos moleculares utilizados corresponden a la caracterización genética realizada mediante seis marcadores SSR (Mo05, Mo07, Mo08, Mo09, Mo13 y Mo16) desarrollados específicamente para *P. chilensis* (Mottura *et al.*, 2005). Dicha caracterización fue realizada a partir de ADN extraído de material foliar de cada árbol adulto (Mottura, 2006). Debido a que en muchos casos no hubo amplificación se seleccionaron aquellos individuos que fueron caracterizados con al menos cuatro de los seis marcadores. El número total de alelos sobre todos los individuos para los seis marcadores es 68 (Tabla 2).

El marcador más polimórfico es Mo16, con 15 alelos. El marcador Mo05 es el único que es más polimórfico en *P. chilensis* y en los híbridos que en *P. flexuosa*. El resto de los marcadores son muy polimórficos en *P. flexuosa* y poco polimórficos para *P. chilensis*, lo cual probablemente se deba a la diferencia en el número de individuos caracterizados en cada grupo. Sin embargo, existen alelos exclusivos tanto para *P. flexuosa* como para *P. chilensis*. Como es de esperar, en los híbridos no se detecta ningún alelo exclusivo. El marcador Mo07 tiene un alelo exclusivo de *P. chilensis* (209). Respecto a Mo08, todos los alelos se encuentran presentes en *P. flexuosa*, mientras que *P. chilensis* presenta 5 de los 10 alelos. El marcador Mo09 presenta cinco alelos muy poco frecuentes (203, 223, 227, 235 y 245) presentes sólo en *P. flexuosa* y con frecuencias menores a 0,01. En *P. chilensis* este marcador es muy poco polimórfico (dos alelos), siendo el alelo 209 muy frecuente en éste grupo. En la Tabla 2 puede observarse que la heterocigosidad observada para este marcador es la más alta ($H_o = 0,6$). Dos alelos del marcador Mo013 (244 y 246) y tres alelos de Mo16 (149, 17 y 173) no se registraron en *P. flexuosa*.

Análisis estadísticos

Para detectar la estructura espacial de los datos genéticos y morfológicos por separado se utilizaron dos aproximaciones multivariadas: la Prueba de Mantel (Mantel, 1967) y el cálculo del índice de autocorrelación espacial de Moran (Moran, 1950) de las primeras variables sintéticas obtenidas mediante Análisis de Componentes Principales. La prueba de Mantel es una de las herramientas estadísticas más utilizadas para evaluar la significancia estadística de la dependencia entre dos matrices de distancias. Para detectar estructura genética espacial (EGE) se evaluó la correlación entre una matriz de distancias genéticas y una matriz de distancias geográficas, mientras que para detectar estructura fenotípica espacial (EFE) se utilizaron las matrices de distancias morfológicas y de distancias geográficas. En todos los casos se utilizaron las distancias Euclídeas, calculadas sobre la matriz de frecuencias alélicas (distancias genéticas) sobre los datos morfológicos estandarizados (distancias morfológicas) y sobre las coordenadas geográficas (distancias geográficas). La evaluación de la significancia del estadístico de Mantel se realizó mediante valores-p obtenidos por permutación (9999 permutaciones). Los análisis se realizaron con las librerías “bioDist” (Ding *et al.*, 2008) y “vegan” (Oksanen *et al.*, 2011) en R (R Development Core Team, 2011). La

segunda aproximación metodológica (Novembre *et al.*, 2008; Teich *et al.*, 2014) consistió en realizar Análisis de Componentes Principales sobre las frecuencias alélicas y sobre las variables morfológicas y luego calcular la autocorrelación espacial de las primeras componentes obtenidas mediante el Índice de Moran utilizando la red de conexión de Gabriel (Gabriel y Sokal, 1969). La primera componente principal de los datos genéticos fue denotada por CP_{1g} mientras que la primera componente principal de los datos morfológicos se denotó como CP_{1m}. Estos análisis se realizaron mediante las librerías de R “adegenet” (Jombart, 2008) y “spdep” (Bivand *et al.*, 2011). A los fines de visualizar la estructura espacial, con las componentes principales cuya autocorrelación espacial resultó estadísticamente significativa, se realizó un mapa sintético de variabilidad mediante interpolación lineal de la variable sintética utilizando el inverso de la distancia de grado 2.

El análisis de asociación entre variabilidad genética y fenotípica se realizó con tres métodos multivariados: (1) Prueba de Mantel entre las matrices de distancias Euclídeas genéticas y morfológicas; (2) Análisis de Correlaciones Canónicas (ACC); y (3) Análisis de Procrustes Generalizado (APG). En las dos primeras aproximaciones la significancia fue evaluada tanto sin considerar la autocorrelación espacial como contemplando correlaciones espaciales. En el caso de la prueba de Mantel, la autocorrelación se contempló incorporando una matriz de distancias espaciales (Prueba de Mantel Parcial) (Smouse *et al.*, 1986). Para evaluar la significancia de la correlación entre un determinado par de variables canónicas se usaron dos MLM alternativos, y según el criterio de Akaike (AIC) se seleccionó el mejor modelo. Los MLM ajustados consideraron a la variable canónica construida con datos morfológicos como variable respuesta y, como variable regresora (dentro de los efectos fijos) a la variable canónica del mismo par, conformada a partir de datos genéticos. La diferencia entre ambos modelos se produjo al momento de especificar la estructura de la matriz de varianza y covarianza de los términos de error aleatorio. En el Modelo 1 la matriz error se supuso no correlacionada. En el Modelo 2 se especificó una matriz de tipo espacial, con decaimiento exponencial de las correlaciones entre datos de la variable canónica según se incrementa la distancia entre árboles. La raíz cuadrada del R^2 de este modelo se usó como el coeficiente de correlación canónica entre el par de variables canónicas analizadas y la significancia

de la asociación fue evaluada mediante el valor-p de la prueba de hipótesis de la pendiente del MLM ajustado. Los MLM se implementaron mediante la librería “lme4” (Bates *et al.*, 2015) en R a través de la interfaz que ofrece el programa estadístico Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2011). Además se estimó la “estructura canónica total”, *i.e.* las correlaciones simples entre las variables respuestas y las

variables canónicas. En el caso del APG, se cuantificó la asociación no necesariamente lineal entre datos genéticos y morfológicos del conjunto total de datos y de cada individuo en particular, de manera de luego comparar el porcentaje de consenso entre *P. chilensis*, *P. flexuosa* y los híbridos mediante un test de ANOVA y comparaciones a posteriori según el test de LSD.

Tabla 1. Caracteres morfológicos seleccionados y su abreviatura

NPI	Número de pares de pinnas
LPI	Largo de la pinna (mm)
NFO	Número de pares de foliolos
DIFOL	Distancia entre foliolos en la pinna (mm)
LF	Largo del foliolulo (mm)
L-AF	Relación Largo/Ancho del foliolulo
AR	Área del foliolulo (cm ²)
AFOL	Área total de la hoja (cm ²)
LPE	Largo del pecíolo
API	Relación entre el área del tercio superior del foliolulo respecto del rectángulo en que se inscribe la misma
G-AFR	Relación ancho/grosor de fruto
APT	Relación entre la superficie del tercio superior del foliolulo respecto del área total del foliolulo
FAL	Falcado (Relación entre la distancia desde el ápice hasta la base del foliolulo y la longitud de una línea que pasa por el centro del foliolulo)

Tabla 2. Polimorfismo y heterocigosidad de los seis marcadores moleculares en los 81 individuos del enjambre híbrido entre *P. flexuosa* y *P. chilensis*.

	Mo05	Mo07	Mo08	Mo09	Mo13	Mo16
Número de alelos (Na)	3	12	10	15	13	15
Número de alelos efectivos (Ne)	1,753	3,224	7,674	5,069	3,699	8,209
Heterocigosidad observada (Ho)	0,128	0,379	0,593	0,493	0,543	0,446
Heterocigosidad esperada (He)	0,430	0,690	0,870	0,803	0,730	0,878

RESULTADOS

Análisis de estructura espacial de la variabilidad genética y morfológica

No se detectó EGE en los individuos del enjambre híbrido de *Prosopis* sp. La Prueba de Mantel entre distancias genéticas y geográficas no resultó significativa ($r = -0,014$, $p = 0,6$) y ninguna de las dos primeras variables sintéticas ($CP1_g$ y $CP2_g$), que explican el 17 % y el 14 % de la variabilidad, presentó autocorrelación espacial estadísticamente significativa. Sin embargo, la primera componente principal de los datos morfológicos ($CP1_m$), que explica un 54 % de la variabilidad morfológica observada, presentó autocorrelación espacial estadísticamente significativa según el Índice de Moran ($I = 0,15$, $p = 0,02$). El coeficiente de correlación de la Prueba de Mantel fue de 0,062, siendo significativo con un nivel de significación del 10 % ($p = 0,1$). En la Tabla 3 se presentan los índices de autocorrelación de Moran y su significancia para cada una de las variables morfológicas originales y para la primera variable sintética morfológica. Entre las variables morfológicas con mayor autocorrelación espacial se encuentran aquellas que caracterizan el tamaño del foliolulo (LF, AR, API). La distribución espacial de la variabilidad morfológica se puede observar en el mapa sintético realizado con la $CP1_m$ (Figura 1) donde también se grafican los individuos según su posición geográfica.

Asociación entre datos genéticos y fenotípicos

Cuando se evaluó la asociación entre la variabilidad genética y morfológica a través de la correlación entre matrices de distancias, la incorporación de la información espacial modificó la conclusión respecto a la significancia de la prueba de Mantel. En el caso en que no se incluyó la matriz de distancias geográficas (Prueba de Mantel Simple) la prueba de asociación arrojó un valor-p de 0,056. Sin embargo, al aplicar la Prueba de Mantel Parcial, que incluyó como matriz control a las distancias geográficas, la asociación entre las distancias morfológicas y las distancias genéticas resultó significativa ($p = 0,045$). El coeficiente de correlación fue de 0,103.

El Análisis de Correlaciones Canónicas también permitió concluir que la variabilidad genética se encuentra asociada a la variabilidad morfológica de los individuos del enjambre híbrido. Todas las correlaciones canónicas resultaron significativas tanto si su evaluación se realizó considerando la autocorrelación espacial en las variables canónicas morfológicas o no. En algunos casos la incorporación de la estructura espacial resultó en una mejora del ajuste logrado según el criterio de AIC. En la Tabla 4 se presentan los valores de los criterios de AIC usados para seleccionar el modelo más apropiado para evaluar la significancia de la correlación canónica con un MLM, en el

Tabla 3. Autocorrelación espacial de las variables morfológicas y de las primeras componentes principales obtenidas mediante un ACP.

Variable morfológica	Índice de Moran	Valor p
NPI	0,06	0,20
LPI	0,12	0,06
NFO	0,03	0,31
DIFOL	0,15	0,03
LF	0,16	0,02
L-AF	0,05	0,22
AR	0,16	0,01
AFOL	0,07	0,15
LPE	-0,05	0,67
API	0,20	0,01
G-AFR	-0,02	0,55
APT	0,15	0,03
FAL	0,05	0,24
$CP1_m$	0,15	0,02

Tabla 4. Criterios Akaike (AIC) y prueba del cociente de verosimilitud (LRT) para modelos de regresión entre pares de variables canónicas (morfológicas y genéticas) con errores independientes y correlacionados espacialmente.

Par de variables canónicas	AIC	
	Errores Independientes	Errores correlacionados
1	-89,6	-89,6
2	-46,1	-44,7
3	-27,4	-28,0
4	5,2	7,1
5	63,6	65,6
6	79,4	80,8
7	116,9	118,9
8	129,5	131,5
9	138,0	138,0
10	171,8	173,8
11	193,7	191,7
12	194,6	196,6
13	218,3	220,3

contexto de posible autocorrelación de la variable respuesta. Todas las correlaciones canónicas resultaron significativas ($p < 0,0001$) y con coeficientes de correlación altos (Tabla 5). Estos resultados confirman una asociación estadísticamente significativa entre la diversidad genética y la morfológica en el enjambre híbrido. Las variables morfológicas que se correlacionan más fuertemente con el primer eje canónico (Eje 1m), son el falcado (FAL), APT y API, las cuales caracterizan la forma del foliolulo, mientras que los alelos 240, 244 y 234 de Mo13 y el alelo 151 de Mo16 son los más correlacionados con el primer eje canónico (Tabla 6). Estas son las variables de mayor contribución en la correlación de la variabilidad genética y fenotípica. En el segundo par de ejes

canónicos las variables morfológicas más correlacionadas con la variable sintética son el área y el largo del foliolulo (AR y LF), así como API, mientras que el alelo 151 de Mo16 y el 226 de Mo13 son los más correlacionados con el segundo eje.

El consenso entre la caracterización molecular y fenotípica resultó del 67 %. El primer eje del APG resume un 58 % de la variabilidad del consenso y el segundo eje explica un 6 % (Figura 2). *P.flexuosa* fue el grupo que mostró la menor proporción de consenso entre la caracterización genética y morfológica (0,63) mientras que los híbridos y *P.chilensis* no se diferenciaron entre sí respecto a la proporción de consenso, con porcentajes de consenso entre ambos tipos de datos mayores al 70 % (Figura 3).

Tabla 5. Coeficientes de correlación canónica y significancia (valor p).

Correlación Canónica	Coeficiente de correlación	Valor p ¹
1	0,992	0,004
2	0,986	0,004
3	0,985	0,004
4	0,974	0,004
5	0,945	0,004
6	0,932	0,004
7	0,889	0,004
8	0,867	0,004
9	0,849	0,004
10	0,762	0,004
11	0,678	0,004
12	0,663	0,004
13	0,490	0,004

Tabla 6. Coeficientes de Pearson para la correlación entre el primer par de ejes canónicos y los caracteres morfológicos (A) y los 10 alelos más correlacionados (B).

(A)	Eje 1 _m
FAL	60,31
APT	49,0
AR	6,79
L_AF	0,95
NFO	0,26
DIFOL	0,23
LPE	0,06
AFOL	0,05
LPI	-0,07
G_AFR	-0,63
NPI	-1,22
LF	-5,4
API	-25,31

(B)	Eje 1 _g
Mo13.240	16,73
Mo16.151	14,07
Mo13.244	12,48
Mo13.234	10,56
Mo09.223	9,89
Mo07.197	9,22
Mo09.213	8,28
Mo13.206	7,72
Mo13.218	7,43
Mo07.209	-7,8

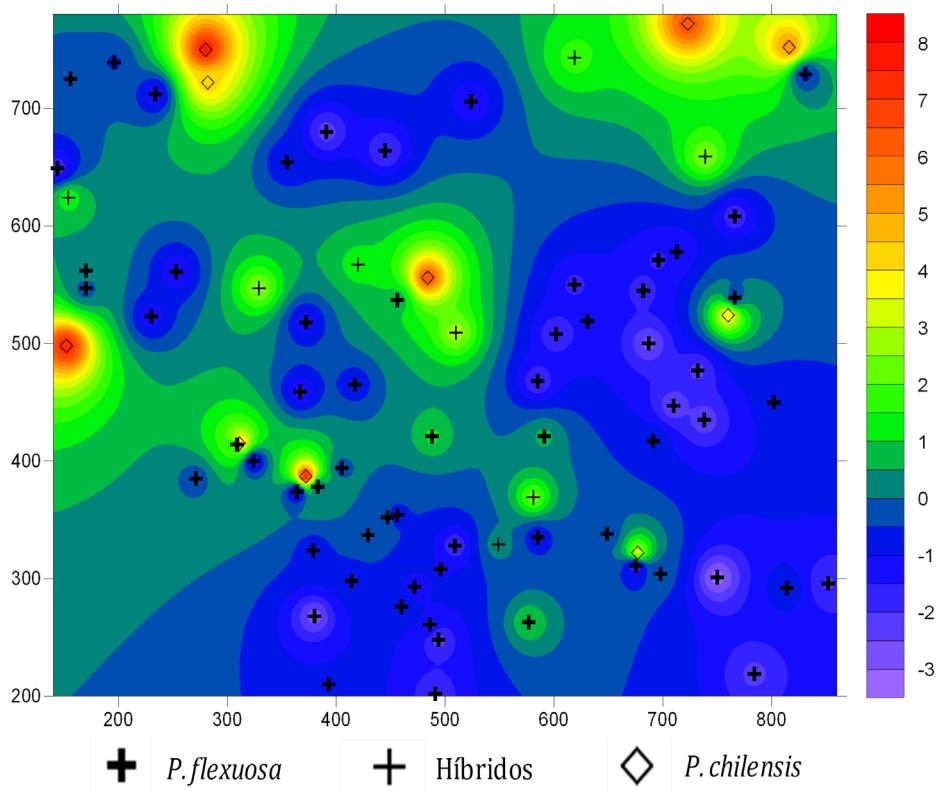


Figura 1. Mapa sintético de la variabilidad morfológica de un enjambre híbrido de *Prosopis* sp. obtenido mediante la interpolación de la CP_{1m}

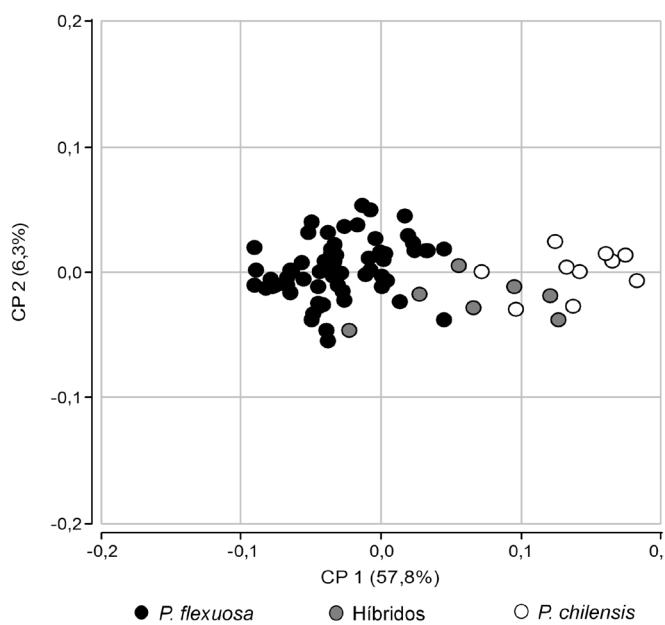


Figura 2. Ordenación de consenso entre la variabilidad genética y morfológica de 81 árboles pertenecientes a un enjambre híbrido de *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa*. El gráfico sugiere una clara diferenciación entre los individuos de ambas especies y una mayor variabilidad entre los individuos clasificados como híbridos.

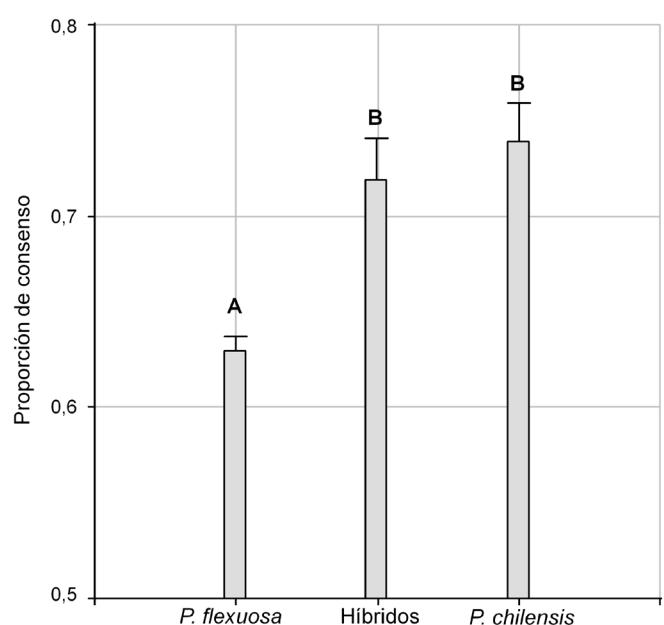


Figura 3. Proporción de consenso promedio (\pm EE) entre los datos genéticos y los datos morfológicos para los individuos de cada grupo. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias de consenso de los grupos morfológicos definidos *a priori*.

DISCUSIÓN

A pesar de que en especies de plantas la variabilidad genética suele estar estructurada espacialmente (Vekemans y Hardy, 2004), no se detectó EGE en el enjambre híbrido de *P. flexuosa* y *P. chilensis* analizado. La alta densidad de individuos (alrededor de 200 árboles/ha) podría ser motivo de la ausencia de estructura espacial de la variabilidad genética. En áreas con altas densidades de árboles, el solapamiento de las áreas de dispersión de semillas puede producir la mezcla de progenies de diferentes individuos. En esos casos se espera que la EGE sea débil (Hamrick *et al.*, 1993; Degen *et al.*, 2001). El estudio espacial de la variabilidad morfológica, en cambio, detectó estructura espacial. La asociación entre la variabilidad genética y morfológica fue detectada por los tres métodos empleados contribuyendo al proceso de diferenciación de unidades de uso y conservación de Algarrobo. A pesar de la débil estructura espacial en los datos, la incorporación de la autocorrelación espacial mejoró la capacidad de detección y modelación de la asociación entre la variabilidad genética y fenotípica observada en el enjambre híbrido. En el caso de la Prueba de Mantel modificó la significancia de la prueba y en el caso del ACC mejoró el ajuste del modelo que relaciona la variabilidad morfológica con la genética, expresadas ambas por variables canónicas.

Existe una larga discusión en la literatura sobre la pertinencia de la aplicación de la Prueba de Mantel Parcial, y en particular cuando ambos conjuntos de datos presentan autocorrelación espacial (Oden y Sokal, 1992; Dutilleul *et al.*, 2000; Raufaste y Rousset, 2001; Castellano y Balletto, 2002; Rousset, 2002; Legendre y Fortin, 2010; Guillot y Rousset, 2013). Claramente esta controversia no está resuelta aún y la Prueba de Mantel Parcial sigue siendo una de las más utilizadas para evaluar asociaciones bajo autocorrelación espacial. En nuestro trabajo la incorporación de la estructura espacial, aunque ésta era débil, permitió detectar asociaciones multivariadas entre datos genéticos y morfológicos que luego fueron confirmadas por el ACC. Otra forma de incluir la información espacial en estudios de asociación con ACC es la utilizada por Sork *et al.* (2010), donde estudian la asociación entre datos genéticos (microsatélites) y climáticos en bosques del hemisferio norte. Los autores determinaron la

contribución de variables geográficas a la construcción de una variable canónica climática particionando la suma de cuadrados total (no debida al error) de la variable canónica en tres componentes: una debida sólo a las coordenadas geográficas, otra sólo a variables climáticas y otra a la colinealidad entre ambas.

Es importante notar que el ACC asume correlación del tipo lineal y que otras correlaciones pueden pasar desapercibidas con este análisis. El APG, en cambio, permite detectar asociaciones no necesariamente lineales (Bramardi *et al.*, 2005). La ordenación de consenso de los individuos del enjambre híbrido bajo estudio permitió diferenciar principalmente a *P. flexuosa* de *P. chilensis*. Los híbridos, si bien se diferencian morfológicamente tanto de *P. flexuosa* como de *P. chilensis*, genéticamente no se pueden diferenciar de *P. chilensis*, al menos con los seis SSR utilizados en este trabajo (Teich, 2012). Los resultados de Mottura (2006) sugieren que si bien existe un fuerte flujo génico entre los diferentes grupos morfológicos, éste es asimétrico. La baja diferenciación de los híbridos en el espacio de consenso probablemente se deba a las mayores tasas de apareamiento de los mismos con individuos de *P. chilensis* y por lo tanto a los mayores niveles de introgresión hacia este grupo. Asimismo, nuestros resultados indican que la proporción de consenso entre datos genotípicos y fenotípicos de estos dos grupos es mayor que la observada en *P. flexuosa*.

La alta asociación detectada entre la variabilidad genética y fenotípica confiere valor taxonómico a los caracteres morfológicos propuestos para clasificación de híbridos de *P. flexuosa* y *P. chilensis*. Si bien los tres grupos de algarrobos analizados presentan identidad a nivel morfológico, respecto al consenso entre la información fenotípica y genética sólo se diferencian *P. flexuosa* y *P. chilensis*. Los híbridos no se reconocen como una unidad independiente respecto al nivel de asociación fenotipo-genotipo, al menos para los marcadores moleculares y los caracteres morfológicos analizados. Respecto a la incorporación de la autocorrelación espacial de los datos en estudios de asociación, concluimos que su omisión puede afectar los resultados de los estudios de asociación entre variabilidad genética y morfológica, aún cuando la estructura espacial en una u otra sea débil.

BIBLIOGRAFÍA

- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2011) InfoGen versión 2011. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
- Balzarini M.G., Teich I., Bruno C., Peña A. (2011) Making genetic biodiversity measurable: a review of statistical multivariate methods to study variability at gene level. Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo 43: 261-275.
- Bates D., Mächler M., Bolker B., Walker S. (2015) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-9.
- Bessegá C.F., Ferreyra L., Vilardi J., Saidman B.O. (2000) Unexpected low genetic differentiation among allopatric species of section Algarobia of Prosopis (Leguminosae). Genética 109: 255-266.
- Bivand R., Altman M., Anselin L., Assunção R., Berke O., Bernat A., Blanchet G., Blankmeyer E., Carvalho M., Christensen B., ChunY., Dormann C., Dray S., Halbersma R., Krajnáki E., Legendre P., Lewin-Koh N., Hongfei Li J.M., Millo G., Mueller W., Ono H., Peres-Neto P., Piras G., Reder M., Tiefelsdorf M., Yu D. (2011) spdep: Spatial dependence: weighting schemes, statistics and models. R package version 0.5-31.
- Bonferroni C. E. (1936) Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Pub. Ist. Sup. Sci. Econom. Com. di Firenze 8: 3-62.
- Brachi B., Faure N., Horton M., Flahauw E., Vazquez A., Nordborg M., Bergelson J., Cuguen J., Roux F. (2010) Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. PLoS Genet. 6: e1000940.
- Bramardi S.J., Bernet G.P., Asíns M.J., Carbonell E.A. (2005) Simultaneous agronomic and molecular characterization of genotypes via the Generalised Procrustes Analysis. Crop Sci. 45: 1603-1609.
- Carrari F., Schauer N., Willmitzer L., Fernie A. (2006) Systems biology: a renaissance of the top-down approach for plant analysis. In: Saito K., Dixon R.A., Willmitzer L. (Eds) Plant Metabolomics. Springer Berlin Heidelberg, pp 185-198.
- Castellano S., Balletto E. (2002) Is the partial Mantel test inadequate? Evolution 56: 1871-1873.
- Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z., Kearsey M.J., Werner P., Harrap D., Tapsell C., Liu H., Hedley P.E., Stein N., Schulte D., Steuernagel B., Marshall D.F., Thomas W.T.B., Ramsay L., Mackay I., Balding D.J., Consortium T.A., Waugh R., O'Sullivan D.M. (2010) Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 21611-21616.
- Degen B., Caron H., Bandou E., Maggia L., Chevallier M.H., Leveau A., Kremer A. (2001) Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. Heredity 87: 497-507.
- Ding B., Gentleman R., Carey V. (2008) bioDist: Different distance measures. R package version 1.40.0.
- Dutilleul P., Jason D.S., Frigou D., Legendre P. (2000) The Mantel test versus Pearson's correlation analysis: assessment of the differences for biological and environmental studies. J. Agric. Biol. Env. S 5: 131-150.
- Gabriel K.R., Sokal R.R. (1969) A new statistical approach to geographic variation analysis. Syst. Biol. 18: 259-278.
- Gower J. (1975) Generalized procrustes analysis. Psychometrika 40: 33-51.
- Guillot G., Rousset F. (2013) Dismantling the Mantel tests. Methods Ecol. Evol. 4: 336-344.
- Hamrick J.L., Murawski D.A., Nason J.D. (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. Plant Ecol. 107-108: 281-297.
- Hotelling H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. J. Educ. Psychol. 24: 417-411.
- Houle D., Govindaraju D.R., Omholt S. (2010) Phenomics: the next challenge. Nat. Rev. Genet. 11: 855-866.

- Hunziker J.H., Saidman B.O., Naranjo C.A., Palacios R.A., Poggio L., Burghardt A.D. (1986) Hybridization and genetic variation of Argentine species of *Prosopis*. Forest Ecol. Manag. 16: 301-315.
- Jombart T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24: 1403-1405.
- Jombart T., Pontier D., Dufour A.B. (2009) Genetic markers in the playground of multivariate analysis. Heredity 102: 330-341.
- Keitt T.H., Bjørnstad O.N., Dixon P.M., Citron-Pousty S. (2002) Accounting for spatial pattern when modeling organism-environment interactions. Ecography 25: 616-625.
- Legendre P., Fortin M.J. (2010) Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. Mol. Ecol. Resour. 10: 831-844.
- Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D. (2006) SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Moran P.A.P. (1950) Notes on continuous stochastic phenomena. Biometrika 37 (1/2): 17-23.
- Mottura M.C. (2006) Development of microsatellites in *Prosopis* spp. and their application to study the reproduction system. Tesis Doctoral Georg-August University of Göttingen, Göttingen.
- Mottura M.C., Finkeldey R., Verga A.R., Gailing O. (2005) Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. Mol. Ecol. Notes 5: 487-489.
- Novembre J., Johnson T., Bryc K., Kutalik Z., Boyko A.R., Auton A., Indap A., King K.S., Bergmann S., Nelson M.R., Stephens M., Bustamante C.D. (2008) Genes mirror geography within Europe. Nature 456: 98-101.
- Oden N., Sokal R. (1992) An investigation of three-matrix permutation tests. J. Classif. 9: 275-290.
- Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Wagner H. (2011) vegan: Community Ecology R Package.
- Pasiecznik N.M., Felker P., Harris P.J.C., Harsh L.N., Cruz G., Tewari J.C., Cadoret K., Maldonado L.J. (2001) The *Prosopis juliflora* - *Prosopis pallida* complex: a monograph. HDRA, Coventry, United Kingdom.
- R Development Core Team R (2011) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Raufaste N., Rousset F. (2001) Are partial mantel tests adequate? Evolution 55: 1703-1705.
- Rousset F. (2002) Partial Mantel Tests: Reply to Castellano and Balletto. Evolution 56: 1874-1875.
- Saidman B.O. (1990) Isoenzyme studies on hybrid swarms of *Prosopis caldenia* and sympatric species. Silvae Genet. 39: 5-8.
- Saidman B.O., Bessega C.F., Ferreira L.I., Julio N., Vilardi J. (2000) The use of genetic markers to assess population structure and relationships among species of the genus *Prosopis* (Leguminosae). Bol. Soc. Argent. Bot. 35: 315-324.
- Smouse P.E., Long J.C., Sokal R.R. (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. Syst. Zool. 35: 627-632.
- Sork V.L., Davis F.W., Westfall R., Flint A., Ikegami M., Wang H., Grivet D. (2010) Gene movement and genetic association with regional climate gradients in California valley oak (*Quercus lobata* Nee) in the face of climate change. Mol. Ecol. 19: 3806-3823.
- Teich I. (2012) Análisis de la estructura genética espacial de especies arbóreas y su asociación con la variabilidad fenotípica y ambiental. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Teich I., Planchuelo A.M., Balzarini M. (2011) Análisis de asociaciones en escenarios de datos masivos. 40JAIIO-Congreso Argentino de AgroInformática 166-177.

Teich I., Verga A., Balzarini M. (2014) Assessing spatial genetic structure from molecular marker data via principal component analyses: A case study in a *Prosopis* sp. forest. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 5: 89-99.

Vega M.V., Hernández P. (2005) Molecular evidence for natural interspecific hybridization in *Prosopis*. *Agroforest Syst.* 64: 197-202.

Vekemans X., Hardy O.J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* 13: 921-935.

Verga A. (2000) Clave para la identificación de híbridos entre *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* sobre la base de caracteres cuantitativos. *Multequina* 9: 17-22.

Verga A.R. (1995) Genetische Untersuchungen an *Prosopis chilensis* und *P. flexuosa* (Mimosaceae) im trockenen Chaco Argentinien. *Göttingen Research Notes in Forest Genetics* 19:1-96. PhD thesis, Department of Forest Genetics and Tree Breeding, Faculty of Forestry, University of Gottingen.

Verga A.R., López Lauenstein D., López C., Navall M., Joseau J., Gómez C., Royo O., Degano W., Marcó M. (2009) Caracterización morfológica de los algarrobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina. *Quebracho* 17: 31-40.

ACETALDEHYDE INDUCED DEVELOPMENTAL AND GENETIC DAMAGE IN *Drosophila melanogaster*

DAÑO GENÉTICO Y DEL DESARROLLO INDUCIDO POR ACETALDEHIDO EN *Drosophila melanogaster*

Palermo A.M.^{1*}, Mudry M.D.²

¹CITEDEF (Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa). J.B. de La Salle 4397 (B1603ALO), Buenos Aires, Argentina.

²GIBE (Grupo de Investigación en Biología Evolutiva), FCEyN-UBA; IEGEBA-CONICET (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires - Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas). Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4º Piso Labs. 43-46. (C1428EHA) Buenos Aires, Argentina.

* Author for correspondence
apalermo@citedef.gov.ar

ABSTRACT

Acetaldehyde (AAld) is a ubiquitous compound in the environment. Exposure may occur in its manufacture or use, in the consumption of alcoholic beverages and through cigarette smoke. It causes distant target effects, including DNA damage, glutathione depletion, enzyme inactivation and cell death. In the present work, its potential teratogenic, mutagenic and recombinagenic effects in somatic cells of *D. melanogaster* were analyzed. The *white/white+ (w/w+)* eye mosaic test (Somatic Mutation And Recombination Test, SMART) was applied by mating *w/w* females with *y/Y* males. Larvae of 48 ± 4 h were transferred to media with 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % and 0.10 % AAld for 12 hs and then moved to regular media until pupation. The emerging *w/w+* females were evaluated for malformations in those exposed to the two lower concentrations, and for the presence of white light spots (LS) in the exposed to AAld at the three higher concentrations. A significant increase in the number of malformations was observed in adults born from larvae chronically exposed to AAld. The number of LS that resulted from loss of heterozygosity (LOH) in treated larvae was modified by 0.05 % and 0.10 % AAld that yielded a more than twice rise in the control values of LS/100 eyes ($p < 0.05$). Our findings confirm that AAld is capable by itself of altering the regulation of development and inducing genetic damage in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. These, together with results previously reported in other *in vivo* and *in vitro* model systems, highlights the potential role of AAld in the pathogenesis of fetal alcohol syndrome.

Key words: ethanol, teratogenesis, mutagenesis, loss of heterozygosity, eye-spot test

RESUMEN

La exposición a acetaldehído (AAld), un compuesto muy ubicuo en el ambiente, ocurre durante su fabricación y uso, con el consumo de bebidas alcohólicas y/o por el humo de cigarrillos. Causa efectos sobre blancos distantes que incluyen daño al ADN, disminución de glutatión, inactivación enzimática y muerte celular. En este trabajo se estudió su potencial teratogénico y la capacidad de inducir mutagénesis y recombinagénesis en células somáticas de *D. melanogaster*. Se aplicó la prueba de mosaicismo en ojo *white/white+ (w/w+)* (*Somatic Mutation And Recombination Test, SMART*) cruzando hembras *w/w* con machos *y/Y*. Larvas de 48 ± 4 h se mantuvieron por 12 hs en medio con acetaldehído 0,01 %; 0,02 %; 0,05 % y 0,10 % (v/v) y luego se dejaron desarrollar hasta adultos en medio normal. Las dos dosis menores se utilizaron para el estudio de malformaciones, mientras que las tres dosis mayores para el estudio de frecuencia de manchas claras (LS) en los ojos de hembras adultas *w/w+*. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en el número de anomalías en adultos nacidos de larvas expuestas de manera crónica. El número de LS resultantes de la pérdida de heterocigosis (LOH) por los tratamientos de las larvas fue significativo para 0,05 % y 0,10 % (v/v). El AAld produjo un aumento de LS/100 ojos mayor al doble de las frecuencias de control ($p < 0,05$). Estos hallazgos concluyen que el AAld *per se* es capaz de alterar la regulación del desarrollo y de inducir daño genético en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Estos resultados, conjuntamente con resultados previos en otros modelos *in vivo* e *in vitro*, destacan su rol potencial en la patogénesis del síndrome alcohólico fetal.

Palabras clave: etanol, teratogénesis, mutagénesis, pérdida de heterocigosis, eye-spot test

Fecha de recepción: 08/07/2015
Fecha de aceptación de versión final: 26/08/2015

INTRODUCTION

Acetaldehyde (AAld) is a ubiquitous compound in the environment. It is an intermediate product of higher plant respiration that is formed as a product of incomplete wood combustion, coffee roasting, burning of tobacco, vehicle exhaust fumes, coal refining and waste processing. The predominant use of AAld is as an intermediate in the synthesis of other chemicals such as perfumes, polyester resins, and basic dyes. It is also used as a fruit and fish preservative, as a flavoring agent, as a denaturant for alcohol, in fuel compositions, for hardening gelatin and as a solvent in the rubber, tanning, and paper industries. Exposure may occur in the manufacture or use of the compound and in the consumption of alcoholic beverages (USEPA, 2000). Besides, cigarette smoke contains abundant reactive aldehydes, including short-chain ones such as AAld and formaldehyde which are relatively long-lived and highly cell permeative molecules, that can cause distant target effects, including DNA damage, glutathione depletion, enzyme inactivation and cell death (Marchitti *et al.*, 2008).

Acute exposure of rats, rabbits and hamsters showed that AAld has low acute toxicity from inhalation and moderate acute toxicity from oral or dermal exposure (USEPA, 1999). Chronic inhalation in hamsters produced changes in the nasal mucosa and trachea, growth retardation, slight anemia, and increased kidney weight. Mammal symptoms of chronic intoxication are similar to those of alcoholism (USEPA, 1999; 2000). In 2012 AAld was designed as “carcinogenic to humans” (Group 1) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and as a consequence renewed attention was brought to the biological effects of this compound (IARC, 2010; 2012).

Data from animal studies suggest that AAld may be a potential teratogen however information on its reproductive or developmental effects is scarce. The offspring of rats exposed to AAld by injection showed skeletal malformations, reduced birth weight, and increased postnatal mortality (USEPA, 2000).

In their revision of risk assessment and mechanisms of action of aldehydes, Feron *et al.* (1991) concluded that AAld is a genotoxic cross-linking agent with limited or no ability to induce gene mutations in bacteria and mammalian cells *in vitro*, nevertheless it induces chromosomal aberrations and other cytogenetic effects in mammalian cells including human lymphocytes. Recently, Brooks and Zakhari (2014) revised all the biological effects of AAld related to its role

as the primary oxidative metabolite of ethanol considering the different AAld-derived DNA and protein adducts that may affect the genome structure and function. In their review they emphasized the role of AAld effects on the mitochondrial genome taking into account that aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), the primary AAld metabolic enzyme, is located in the mitochondrion. In *Drosophila*, the detoxification of this aldehyde is also mediated by ALDH (Barbancho *et al.*, 1987).

The genotoxic effects reported in the literature indicate that AAld treatments of adult flies resulted in an increased frequency of sex-linked recessive lethals whereas did not affect X chromosomal segregation in oocytes (Woodruff *et al.*, 1985; Vogel, 1992).

Taking into account that studies about developmental effects of AAld are scarce and that, to the best of our knowledge, *Drosophila* larvae had not been previously used as a model system for the evaluation of this compound, the aim of this work was to investigate the potential teratogenic, mutagenic and recombinagenic effects of AAld in fly larvae.

MATERIALS AND METHODS

The *white/white+ (w/w+)* eye mosaic test was applied to evaluate the mutagenic and recombinagenic potential of AAld (ethanal, C_2H_4O , CASRN 75-07-0) in somatic tissues. The principle of the system is the detection of mosaic light spots (LS) in the red eyes of adult females that emerge from exposed larvae that are heterozygous for this marker. LS are the result of “loss of heterozygosity” (LOH) and the consequent expression of the X-linked gene *white*. (Vogel, 1992; Vogel and Nivard, 1993; 1999; 2000).

Strains of *w/w* genotype (white females) and *y/Y* (yellow males) were kindly provided by Dr. Vogel and kept in the fly stocks of the IEGBA-FCEN-UBA. Larvae of 48 ± 4 h were transferred to media containing AAld at concentrations of 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % and 0.10 % (vol/vol) and kept for 12 hs (chronic treatment), when they were removed and maintained in regular media until eclosion. The toxicity was evaluated by comparing the larval or pupal death in control and treated series taking into account that dead larvae appear as dark coloured and that unclosed pupae are easily distinguished from eclosed ones (Palermo and Mudry, 2011). The eyes of the emerging heterozygous *w/w+* females were examined in a solution of 90 % ethanol, 1 % Tween 80 and 9 % water for the presence of white

spots (LS) at a magnification of 40–60x. The number of LS was counted in the eyes of females born from larvae exposed to doses 0.02 %, 0.05 % and 0.10 % and control series, and the number of ommatidia affected in each white clone was also recorded. The somatic reversion frequency was estimated by the number of LS per 100 eyes, in order to consider the possible occurrence of more than one spot per eye. The data were evaluated using the χ^2 test for proportions, and the multiple decision procedure proposed by Frei and Würgler was applied to diagnose the results as positive, negative, inconclusive, or weakly positive (Frei and Würgler, 1988; 1995). The relative frequencies of LS were compared with the respective negative controls. The occurrence of malformations was studied in the adult flies born from larvae treated with doses 0.01 % and 0.02 %. The results were evaluated by the Kastenbaum and Bowman Test for proportions (Kastenbaum and Bowman, 1970).

RESULTS

None of the concentrations tested (0.01 %, 0.02 %, 0.05 % and 0.10 % v/v) showed differences in larvae or pupal death when compared with control values (about 96–98 % of viability).

In our experiments in *D. melanogaster* we found a rise in the number of malformations in adults born from larvae chronically exposed to AAld (Table 1). The total number of malformations was significantly higher at both concentrations studied ($p \leq 0.05$ Kastenbaum and Bowman Test). In control and 0.01 % AAld series only the abdomen is affected, but when the concentration was raised to 0.02 % AAld the abnormalities appeared in abdomen, thorax, wings and eyes.

Regarding AAld genotoxicity, our results with the eye SMART assay are shown in Table 2. Treatments with 0.02 % AAld did not show statistical differences with control values, while 0.05 % and 0.10 % AAld yielded a significant increase in LS/100 eyes that was more than twice the control values ($p < 0.05$, $m=2$). Nevertheless, the response was not dose-dependent, because 0.05 % and 0.1 % AAld treatments gave similar responses compared to concurrent or historical controls. The distribution of spot sizes is shown in Figure 1. Treatments with 0.02 % AAld that did not increase the frequency of LS present a similar distribution to that of concurrent and historic control series, being size 2 the most frequent class of ommatidia. The treatments with 0.05 % and 0.1 % AAld, that showed significant differences in LS compared to control series, presented a different distribution of spot sizes, where the most frequent size class was 3–4.

Table 1. Malformations in *D. melanogaster* adults born from larvae chronically treated with acetaldehyde (AAld).

Treatment	Number of flies	Malformations					Total	%
		Abdomen	Thorax	Wing	Eye	Total		
Control	1645	2	-	-	-	2	2	0.12
AAld 0.01 %	1271	8	-	-	-	8	8	0.63*
AAld 0.02 %	936	2	1	1	2	6	6	0.64*

* $p \leq 0.05$. Kastenbaum and Bowman Test (1970).

Table 2. Frequency of eyes with light spots (LS) after chronic treatment of *D. melanogaster* larvae with acetaldehyde (AAld).

Treatment	Number of eyes	Total	Number of LS							Average clone size	LS per 100 eyes		
			Size (ommatidia)										
			2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64	>64				
Control	614	10	7	1	2	-	-	-	-	6.0	1.6		
AAld 0.02 %	738	9	7	1	-	1	-	-	-	6.2	1.2		
AAld 0.05 %	426	19	6	7	3	2	1	-	-	10.2	4.5 (+)		
AAld 0.10 %	398	17	6	7	2	1	1	-	-	7.6	4.3 (+)		
Historic Control	4960	77	39	23	10	3	1	1	-	9.0	1.6		

(+) positive diagnosis according to Frei and Würgler (1988, 1995) ($p \leq 0.05 \chi^2$ Test, $m=2$).

DISCUSSION

As mentioned in the Introduction, AAld is an active primary metabolic product of ethanol that induces a range of toxic, pharmacological and behavioral responses, due to its ability to elicit cellular and tissue damage (Guo and Ren, 2010). Ethanol is a well-known teratogen, while data about AAld effects on development are scarce. Using frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) Fort *et al.* (2003) found that AAld was markedly more potent as a developmental toxicant than ethanol or acetic acid. In rat embryos exposed to AAld Menegola *et al.* (2001) showed a characteristic embryonic AAld syndrome, histologically characterized by marked cellular death and they proposed that necrosis and apoptosis were the teratological mechanisms responsible of the observed cellular death. In mouse ovary AAld is generated as a by-product during steroidogenesis and can exert toxic effects to impair the differentiation of granulosa cells, reduce ovulation and decrease oocyte quality (Kawai *et al.*, 2012).

Ranganathan *et al.* (1987) using *Drosophila* for developmental toxicity screening concluded that ethanol

itself was responsible for the teratogenic effects observed. However, Langevin *et al.* (2011) found that AAld-mediated DNA damage may critically contribute to the genesis of fetal alcohol syndrome in fetuses, as well as to abnormal development, hematopoietic failure and cancer predisposition in Fanconi anemia patients. Reactive aldehydes are by-products of several metabolic pathways and, without enzymatic catabolism, may accumulate and cause DNA damage. Besides, AAld is able to react with a variety of molecular targets, including DNA and protein, and even to generate an immune response to protein adducts (Romanazzi *et al.*, 2013). These properties justify the hypothesis of being capable by itself, to alter the regulation of the developmental process as it is suggested by the results mentioned above.

Our results are in line with those communicated previously in *Drosophila*, where chronic feeding with AAld gave weak but reproducible effects for spots in the wing spot assay (SMART) (Graf *et al.*, 1989). Moreover, this compound induced sex linked recessive lethals in fly females (Woodruff, 1985) while it failed to increase X chromosome nondisjunction (Rey *et al.*, 1994). Positive

results were also obtained for induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human lymphocytes and in mammal cells *in vitro* (Obe and Ristow, 1977; Obe and Anderson, 1987) for aneuploidy in CHO cells (Dulout and Furnus, 1988) and single strand breaks (SSBs) and double strand breaks (DSBs) in human lymphocytes (Singh and Khan, 1995). AAld raised the frequency of mutation and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* (Albertini *et al.*, 1993). Exposition to AAld has to be considered as an important factor for public health because it could cause an increase in oxidative stress and disease onset, including cancerous transformation processes (Avezov *et al.*, 2014).

Kayani and Parry (2010) reported that while ethanol produces *in vitro* genotoxic effects mainly through an aneugenic mechanism, its metabolite AAld is a clastogen. Kotova *et al.* (2013) observed that AAld effectively blocks DNA replication elongation in mammalian cells, resulting in DNA double-strand breaks associated with replication. It is interesting to emphasize that these findings are in line with the negative results that we obtained in *Drosophila* with ethanol using the *in vivo* eye spot assay of SMART (Palermo *et al.*, 1994) because aneuploid cells are almost inviable in this test system. On the contrary the increased frequency of LS caused by AAld treatments that we report here with the same assay, could occur through a clastogenic mechanism. Our findings confirm that AAld is capable by itself to alter the regulation of development and to induce genetic damage in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, and together with results previously reported in other *in vivo* and *in vitro* systems highlights the potential role of AAld in the pathogenesis of fetal alcohol syndrome.

Brooks and Zakhari (2014) considered that the understanding of how AAld impacts genome function in different cells and under different conditions has important implications not only for alcohol-related carcinogenesis, but also for understanding other pathological effects of alcohol as well. Our results in *Drosophila* intend to contribute to this understanding.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Albertini S., Brunner M., Würgler F.E. (1993) Analysis of the six additional chemicals for *in vitro* assays of the European Economic Communities' EEC aneuploidy programme using *Saccharomyces cerevisiae* D61.M and the *in vitro* porcine brain tubulin assembly assay. Environ. Mol. Mutagen. 21:180-192.
- Avezov K., Reznick A.Z., Aizenbud D. (2014) Oxidative damage in keratinocytes exposed to cigarette smoke and aldehydes. Toxicol. in Vitro 28: 485-491.
- Barbancho M., Sánchez-Cañete F.J., Dorado G., Pineda M. (1987) Relation between tolerance to ethanol and alcohol dehydrogenase (ADH) activity in *Drosophila melanogaster*: selection, genotype and sex effects. Heredity 58: 443-450.
- Brooks P.J., Zakhari S. (2014) Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. Environ. Mol. Mutagen. 55: 77-91.
- Dulout F.N., Furnus C.C. (1988) Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells. Mutagenesis 3: 207-211.
- Feron V.J., Til H.P., de Vrijer F., Woutersen R.A., Cassee F.R., van Bladerer P.J. (1991) Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanisms of action and risk assessment. Mutat. Res. 259:363-385.
- Fort D.J., McLaughlin D.W., Rogers R.L., Buzzard B.O. (2003) Evaluation of the developmental toxicities of ethanol, acetaldehyde, and thioacetamide using FETAX. Drug. Chem. Toxicol. 26: 23-34.
- Frei H., Würgler F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive negative or inconclusive result. Mutat. Res. 203: 297-308.

- Frei H., Würgler F.E. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334: 247-258.
- Graf U., Frei H., Kägi A., Katz A.J., Würgler F.E. (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222: 359-373.
- Guo R., Ren J. (2010) Alcohol and acetaldehyde in Public Health: from marvel to menace. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7: 1285-1301.
- International Agency for Research on Cancer (2010) Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 96, Lyon.
- International Agency for Research on Cancer (2012) Personal Habits and Indoor Combustions. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100: E, Lyon.
- Kastenbaum M.A., Bowman K.O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9: 527-549.
- Kawai T., Mihara T., Kawashima I., Fujita Y., Ikeda C., Negishi H., Richards J.S., Shimada M.. (2012) Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary. *Reprod. Toxicol.* 33: 322-330.
- Kayani M.A., Parry J.M. (2010) The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol. in Vitro* 24: 56-60.
- Kotova N., Vare D., Schultz N., Gradecka Meesters D., Stepnik M., Helleday T., Jenssen D. (2013) Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. *Carcinogenesis* 34: 325-330.
- Langevin F., Crossan G.P., Rosado I.V., Arends M.J., Patel K.J., 2011. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* 475: 53-58.
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4: 697-720.
- Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Giavini E. (2001) Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis. *Alcohol* 23: 35-39.
- Obe G., Anderson D. (1987) Genetic effects of ethanol. *Mutat. Res.* 186: 177-200.
- Obe G., Ristow H. (1977) Acetaldehyde, but not ethanol, induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat. Res.* 56: 211-213.
- Palermo A.M., Mudry M.D. (2011) Genotoxic damage induced by isopropanol in germinal and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 726: 215-221.
- Palermo A.M., Rey M., Muñoz R.E. (1994) Protective effect of ethanol on X-ray induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 24: 137-142.
- Ranganathan S., Davis D.G., Hood R.D. (1987) Developmental toxicity of ethanol in *Drosophila melanogaster*. *Teratology* 36: 45-49.
- Rey M., Palermo A.M., Muñoz E.R. (1994) Lack of effect of acute acetaldehyde treatment on X chromosome segregation in *Drosophila melanogaster* females. *Mutat. Res.* 320: 1-7.
- Romanazzi V., Schilirò T., Carraro E., Gilli G. (2013) Immune response to acetaldehyde-human serum albumin adduct among healthy subjects related to alcohol intake. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36: 378-383.
- Singh N.P., Khan A. (1995) Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 337: 9-17.
- U.S.E.P.A. (1999) Integrated Risk Information System (IRIS) on Acetaldehyde. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, D.C.

U.S.E.P.A. (2000) Technology Transfer Network. Air Toxics Web Site. <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/acetalde.html>.

Vogel E.W. (1992) Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 284: 159-175.

Vogel E.W., Nivard M.J.M. (1993) Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis* 8: 57-81.

Vogel E.W., Nivard M.J.M. (1999) A novel method for the parallel monitoring of mitotic recombination and clastogenicity in somatic cells *in vivo*. *Mutat. Res.* 431: 141-153.

Vogel E.W., Nivard M.J.M. (2000) Parallel monitoring of mitotic recombination, clastogenicity and teratogenic effects in eye tissue of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 455: 141-153.

Woodruff R.C., Mason J.M., Valencia R., Zimmering S. (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. V. Results of 53 coded compounds tested in the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* 7: 677-702.

MENDELIAN ANALYSIS OF RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY TO A TRANSPLANTABLE BREAST TUMOR IN A MURINE MODEL

ANÁLISIS MENDELIANO DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD A UN TUMOR TRASPLANTABLE DE MAMA EN UN MODELO MURINO

Cáceres J.M.¹, Pagura L.¹, Di Masso R.J.^{1,2}, Rico M.J.^{1,3}, Rozados V.R.¹

¹ Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

² CIC-UNR.

³ CONICET.

majorico@gmail.com@mail.com

ABSTRACT

Behavior of breast adenocarcinoma M-406, a type B, semi-differentiated and triple negative (ER-, PR-, HER2-) transplantable tumor was studied in the F₁ and F₂ mice populations derived from crosses between from the inbred lines CBi (susceptible: take 100 %, 100 % lethality) and CBi- (resistant: take 100 %, 100 % regression). Reciprocal hybrids behaved both as CBi (take 100 %, 100 % lethality), revealing the absence of maternal effects. In the F₂ combinations, the tumor grew exponentially in 74.9 % of the animals and was rejected in the remaining 25.1 %, a segregation compatible with the autosomal dominant condition of tumor susceptibility observed in the F₁. Analysis of tumor doubling time in the various F₂ combinations showed a higher growth rate of the tumor when a double genetic load of maternal CBi (susceptible) origin was present in comparison with a double maternal CBi- (resistant) load; this response was not evinced in the remaining two F₂ combinations. This response was only observed in females, suggesting the existence of epigenetic phenomena associated with the sex of the tumor carrier.

Key words: tumor growth, tumor doubling time, mice, triple negative breast cancer.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento del adenocarcinoma de mama M-406, tumor trasplantable tipo B, semi-diferenciado y triple negativo (ER-, PR-, HER-2-), en las poblaciones de ratones F₁ y F₂ derivadas del cruzamiento entre las líneas endocriadas CBi (susceptible, toma 100 %, letalidad 100 %) y CBi- (resistente, toma 100 %, regresión 100 %). Los híbridos recíprocos se comportaron ambos como CBi (toma 100 %, letalidad 100 %), poniendo de manifiesto ausencia de efectos maternos. En las combinaciones F₂, el tumor creció en forma exponencial en 74,9 % de los animales y fue rechazado en el 25,1 % restante; esta segregación compatible con el carácter autosómico dominante de la susceptibilidad al tumor observado en la F₁. El análisis del tiempo de duplicación tumoral en las distintas combinaciones F₂ mostró mayor velocidad de crecimiento del tumor en aquella con doble dosis genética CBi (susceptible) de origen materno que en aquella con doble dosis materna CBi- (resistente), respuesta que no se evidenció en las dos combinaciones F₂ restantes. Esta respuesta sólo fue observada en hembras lo que permite suponer la existencia de fenómenos epigenéticos vinculados con el sexo del portador del tumor.

Palabras clave: crecimiento tumoral, tiempo medio de duplicación, ratón, tumores de mama triple negativos.

Fecha de recepción: 03/10/2014
Fecha de aceptación de versión final: 04/08/2015

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama afecta al 10 % de las mujeres en los países industrializados (Szpirer y Szpirer, 2007). En la Argentina, las estadísticas más recientes publicadas por el Instituto Nacional del Cáncer indican que esta patología constituye un problema importante en salud pública, con una estimación de aproximadamente 18.000 nuevos casos cada año lo cual representa el 17,8 % del total de incidencia de cáncer en el país (Viniegra, 2010). El cáncer de mama, al igual que ocurre en otros tipos de cáncer, es una enfermedad heterogénea, multifactorial, que se presenta en varias formas clínicas e histológicas y en la que, dada su condición de fenotipo complejo, se ven involucrados determinantes genéticos y ambientales (Gould, 1995; Leamy *et al.*, 2012), incluyendo estos últimos aspectos tales como la dieta y el estilo de vida (Bradbury y Olopade, 2007). Con respecto a los aspectos genéticos aproximadamente el 10 % de los cánceres de mama pueden explicarse por la presencia de genes de susceptibilidad, la mayoría de los cuales confieren a los portadores un riesgo moderado de contraer la enfermedad (Foulkes, 2008). Si bien se han descrito en seres humanos algunos genes mayores involucrados en la susceptibilidad al cáncer de mama, como es el caso de BRCA (*Breast Cancer*1 y BRACA2, aún resta mucho por conocer al respecto. La identificación de estos genes es difícil debido, entre otras razones, a su baja penetrancia, al número limitado de individuos por familia y a la heterogeneidad genética existente en las poblaciones humanas (Dahlman *et al.*, 2002). Dada la comprobada proximidad genética entre los ratones y los seres humanos, las líneas endocriadas de estos roedores proveen una herramienta interesante para la identificación de genes involucrados en los patrones de susceptibilidad/resistencia a diferentes tipos de enfermedades entre las que pueden mencionarse las de origen infeccioso y el cáncer (Bedell *et al.*, 1997). Cientos de genes y loci involucrados en diferentes patologías han sido identificados usando modelos murinos (Bedell *et al.*, 1997) reafirmando la utilidad de los animales de laboratorio en la investigación biológica en general y biomédica en particular. Aún hoy, inmersos como estamos en el paradigma molecular, los modelos animales siguen siendo esenciales para comprender los mecanismos responsables de este tipo de fenotipos complejos como así también para identificar blancos moleculares que puedan ser utilizados tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diferentes enfermedades. En la actualidad, la

identificación de los genes y las diferentes vías involucradas en los procesos tumorales han permitido el desarrollo de terapias dirigidas que determinan una mejor respuesta y una mejor calidad de vida de los pacientes (Sawyers, 2004; Collins y Workman, 2006; Workman y de Bono, 2008).

La cepa de ratones CBi, generada en el Centro de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario mediante cruzamientos en los que participaron animales de las cepas BALB, Rockland, Swiss y NIH, se mantiene en el Instituto de Genética Experimental, como una población de cría libre sujeta a un proceso de endocría por limitación del número de individuos. Esta cepa fue utilizada como población base en un experimento de selección artificial por conformación corporal que dio origen a cuatro líneas: CBi/C, CBi/L, CBi⁺ y CBi⁻ (Di Masso *et al.*, 1991) las que han fijado distintas combinaciones alélicas como consecuencia de los efectos conjuntos de las respuestas directas y correlacionadas a la selección, de los efectos no direccionales de la endocría y la deriva génica y de la aparición de nuevas mutaciones (Hinrichsen y Di Masso, 2010).

El adenocarcinoma de mama M-406, surgió espontáneamente en el año 1996 en una hembra de la línea CBi y muestra diferente comportamiento en cada una de las líneas derivadas de ésta por selección. Cuando es inoculado en forma subcutánea (s.c.) M-406 crece en forma exponencial en el 100 % de los animales de la línea CBi mientras que comienza su crecimiento pero es finalmente rechazado en el 100 % de los animales de la línea CBi⁻.

La tasa de crecimiento de un tumor es un indicador ampliamente utilizado no sólo con fines pronósticos sino también para cuantificar los efectos terapéuticos de diferentes modalidades de tratamiento (Usuda *et al.*, 1994; Szereday *et al.*, 2002; Chojniak y Younes, 2003; El Sharouni *et al.*, 2003). Las funciones matemáticas representan una poderosa herramienta para modelizar el proceso dinámico del crecimiento tumoral y el tiempo de duplicación (TdT) del volumen de un tumor, es uno de los indicadores empleados para cuantificar dicho crecimiento (Mehrara *et al.*, 2007). Zacarías Fluck *et al.* (2012) utilizando un modelo de linfoma de células T, demostraron que la expresión de galectina-1 se correlaciona fuertemente, entre otras variables, con el TdT sugiriendo que esta asociación podría ser utilizada como factor pronóstico y en el tratamiento de este tipo de tumores. El objetivo de este trabajo fue

caracterizar, mediante un enfoque mendeliano clásico, el patrón hereditario de la interacción huésped-tumor a partir del análisis de los cruzamientos recíprocos entre dos líneas endocriadas de ratón con diferente comportamiento -CBi (susceptible) y CBi⁻ (resistente) ante el desafío con un adenocarcinoma trasplantable de mama y de las cuatro combinaciones F2, utilizando un modelo matemático de crecimiento tumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Líneas parentales: Se usaron hembras y machos de las líneas CBi y CBi⁻ mantenidas en el Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. CBi es la línea control de un experimento de selección artificial por conformación corporal del que proviene la línea CBi⁻. Durante la selección ambas poblaciones sufrieron un proceso de endocría por limitación del tamaño poblacional (Falconer y Mackay, 2001). Luego de más de cien generaciones de cría selectiva, momento en el que las líneas presentaban un coeficiente de consanguinidad teórico aproximadamente igual a 1 ($F=0,987$), se comenzó a aplicar un sistema regular de endogamia basado en apareamientos hermano con hermano el que se mantuvo por más de treinta generaciones.

Filial 1 (F_1) y Filial 2 (F_2): Para la producción de la F_1 se llevaron a cabo los cruzamientos recíprocos entre individuos de las dos líneas endocriadas. Para generar la F_2 se usaron machos y hembras de ambos híbridos recíprocos lo que permitió disponer de las cuatro combinaciones posibles entre ambas F_1 . Los grupos mencionados de detallan en la Tabla I.

Todos los animales utilizados provenían de camadas estandarizadas a ocho individuos al nacimiento. A partir del destete fueron criados en grupos de cuatro, en cajas de polipropileno (32 x 24 x 10 cm) provistas de viruta de madera, con una temperatura de $23 \pm 1^\circ C$, en ciclos de 12 horas luz/oscuridad y recibieron alimento balanceado peletizado Ratón-Ratas (Cargill Laboratory Chow) y agua *ad libitum*. Los animales fueron tratados según las normas del *Canadian Council on Animal Care* (Canadian Council of Animal Care, 2007).

Tumor

M-406 es un adenocarcinoma de mama tipo B, semi-diferenciado según la clasificación de Squartini (Squartini y Pingitore, 1994), triple negativo (ER⁻, PR⁻, HER-2⁻) (Rico *et al.*, 2012), espontáneo de la línea endocriada CBi que se mantiene *in vivo* por pasajes intraperitoneales (i.p.) en su huésped singeneico.

Modelo experimental

Todos los experimentos fueron realizados con aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR (Proyecto IMED 246. Resolución N° 1563/2008).

El día cero los animales fueron desafiados con trocar en el flanco derecho con tres fragmentos ($\approx 8 \times 10^5$ células) de M-406. El comportamiento del tumor y el estado general de los animales se monitorearon diariamente.

Tamaño tumoral y modelo matemático

Tres veces por semana, a partir del momento en el que el tumor se hizo palpable (día 3-5 post-desafío), se registraron sus diámetros mayor y menor con calibre y se estimó su volumen (V) de acuerdo con la formula [V = (diámetro menor)² x diámetro mayor x 0,4].

Los pares de valores volumen tumoral - tiempo se ajustaron a un modelo exponencial creciente [$V_t = V_i \cdot e^{(k \cdot t)}$], donde V_t es el volumen tumoral (mm^3) alcanzado en el tiempo t , V_i es el volumen inicial del tumor (mm^3), k es la constante de crecimiento exponencial y t es tiempo (días) transcurrido desde el desafío. A partir de los ajustes individuales se calculó el tiempo medio de duplicación tumoral (T_dT) que es función de la tasa de crecimiento exponencial ($T_dT = 0,69/k$).

Análisis estadístico

Para la evaluación de las diferencias entre grupos genéticos se utilizaron las pruebas U de Mann-Whitney o el análisis de la variancia por rangos de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn (GraphPad, versión 3.0) según la comparación involucrara dos o más grupos respectivamente. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $P < 0,05$.

Tabla 1. Grupos genéticos utilizados en el análisis mendeliano del patrón hereditario de la resistencia-susceptibilidad frente al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406

Grupo genético	Denominación	Cruzamiento	Tamaño muestral
Líneas parentales	CBi		² n = 24
	CBi ⁻		n = 20
¹ Híbridos recíprocos F1	F1 A	(CBi x CBi ⁻)	n = 24
	F1 B	(CBi ⁻ x CBi)	n = 24
¹ Combinaciones F2	F2 A	(CBi ⁻ x CBi) x (CBi ⁻ x CBi)	n = 48
	F2 B	(CBi ⁻ x CBi) x (CBi x CBi ⁻)	n = 48
	F2 C	(CBi x CBi ⁻) x (CBi ⁻ x CBi)	n = 48
	F2 D	(CBi x CBi ⁻) x (CBi x CBi ⁻)	n = 48

¹ En los cruzamientos F1 y F2 el genotipo materno se menciona primero

² Número total (igual número de machos y hembras en cada grupo genético)

RESULTADOS

Líneas parentales CBi y CBi⁻

Ante el desafío con el M-406, ambas líneas parentales, independientemente del sexo, mostraron 100 % de toma. En CBi, el tumor creció exponencialmente en el 100 % de los animales (Figura 1A y 1B) hasta alcanzar el tamaño máximo permitido por las normas éticas. En CBi⁻ el tumor creció inicialmente en todos los animales hasta aproximadamente los días 12 a 16 post-desafío, momento a partir del cual comenzó a regresar espontáneamente siendo totalmente eliminado entre los días 26 a 36 en los machos (Figura 1C) y entre los días 16 a 36 en las hembras (Figura 1D). El volumen tumoral (media aritmética ± EE) en el día 7 fue mayor ($P= 0,0504$) en los machos ($124,3 \pm 25,55 \text{ mm}^3$) que en las hembras ($70,3 \pm 14,40 \text{ mm}^3$).

Híbridos Recíprocos (F1A y F1B)

El tumor mostró el 100 % de toma en ambas combinaciones de híbridos F₁ y creció exponencialmente en todos los animales hasta alcanzar el tamaño máximo permitido por las normas éticas

(Figura 2). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral ni entre las combinaciones híbridas, ni entre sexos para cada combinación.

Combinaciones F2 (F2A, F2B, F2C y F2D)

El tumor mostró 100 % de toma en las cuatro combinaciones F₂. Creció exponencialmente en el 75 % de los animales hasta alcanzar el máximo tamaño tumoral permitido por las normas éticas (Figura 3) y regresó espontáneamente en el 25 % restante hasta su eliminación total (Figura 4). El porcentaje de regresión fue mayor en las hembras (33,33 %) que en los machos (10,41 %) ($P< 0,0001$) (Figura 4).

Tiempo medio de duplicación tumoral (TdT)

La Tabla 2 resume los valores del tiempo medio de duplicación tumoral en machos y hembras de los diferentes grupos genéticos analizados. No se observaron diferencias entre sexos en los animales de la línea CBi. En CBi⁻ el tumor fue rechazado en todos los animales independientemente del sexo.

No se observó efecto significativo del sexo sobre el comportamiento de la variable al considerar a ambas combinaciones F_1 en forma conjunta ni al analizar cada híbrido recíproco por separado (Figura 5A). El TdT no mostró diferencias entre sexos cuando se consideraron las cuatro combinaciones F_2 como un

único grupo. Igual resultado se observó en el caso de las combinaciones F_2B y F_2C , mientras que en la combinación F_2A el TdT fue mayor en las hembras que en los machos ($P= 0,0188$) (Figura 5B) y en la F_2D fue mayor en los machos que en las hembras ($P= 0,0407$) (Figura 5B1).

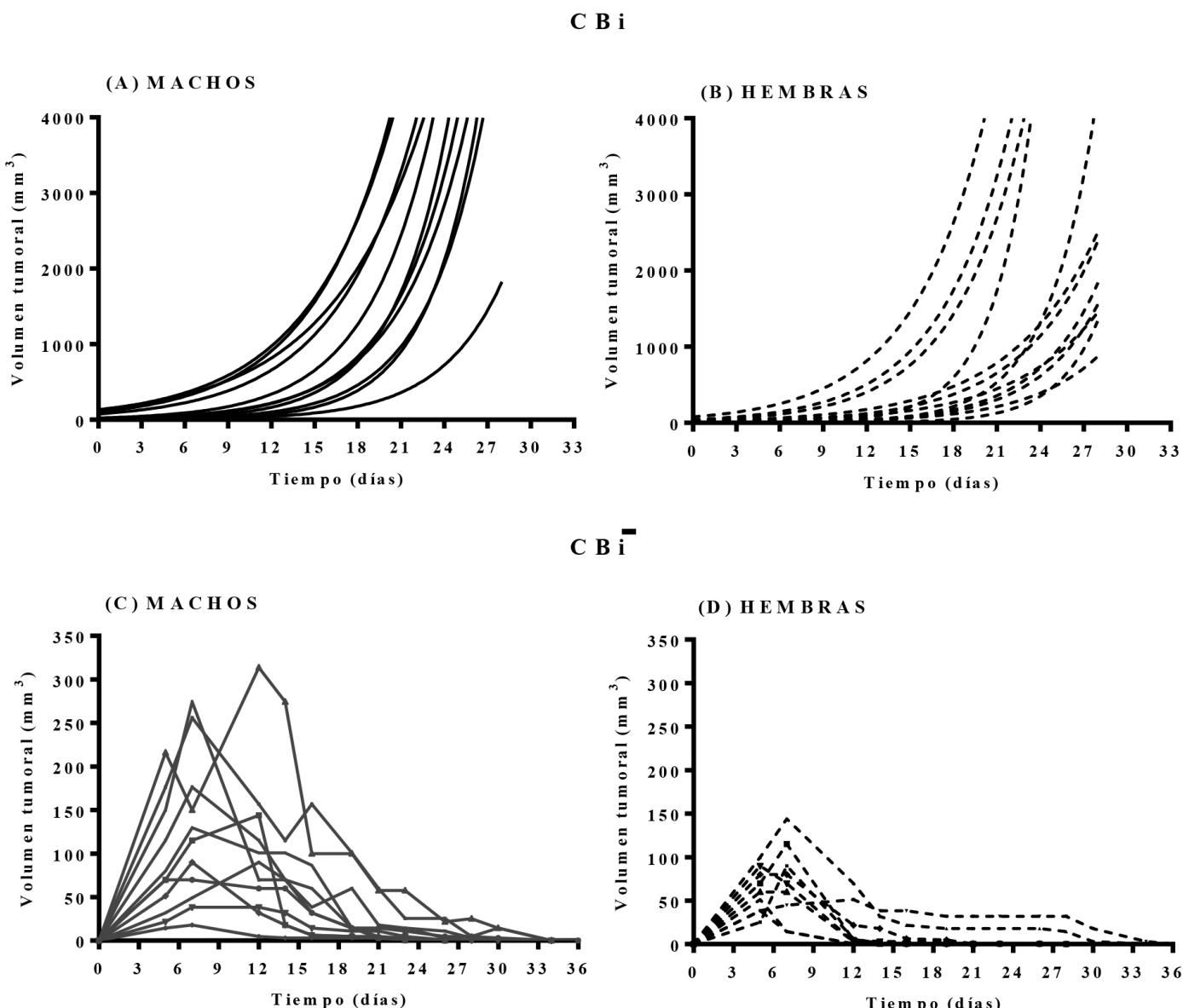
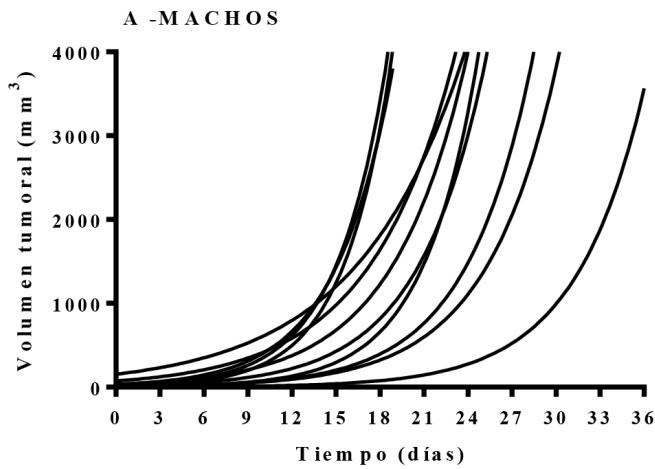
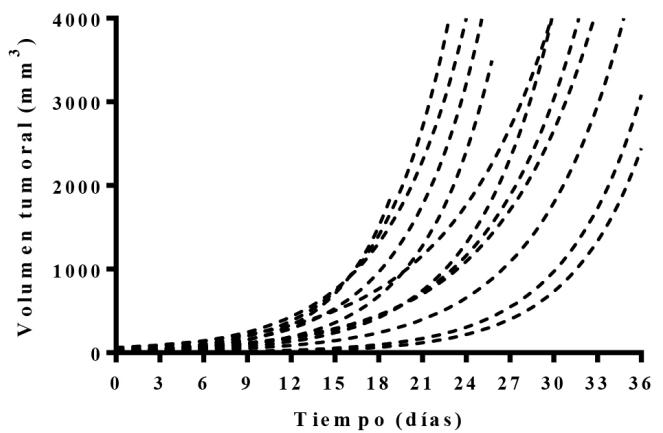


Figura 1. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en machos y hembras de las líneas parentales CBI y CBi.

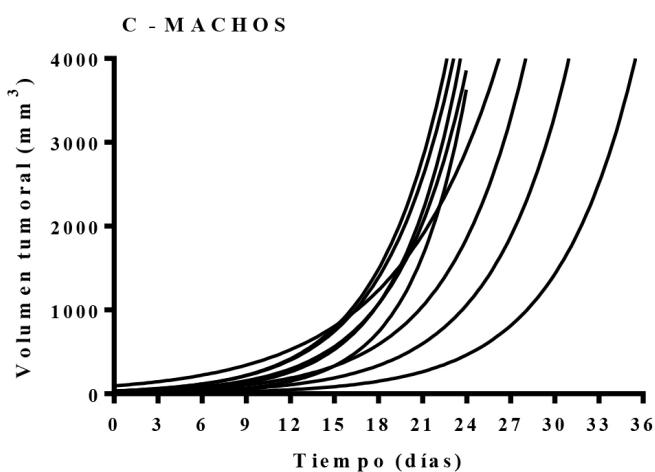
F 1 A



B - HEMBRAS



F 1 B



D - HEMBRAS

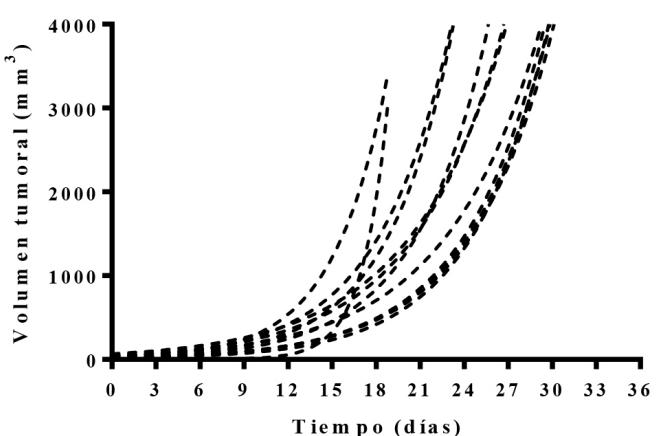
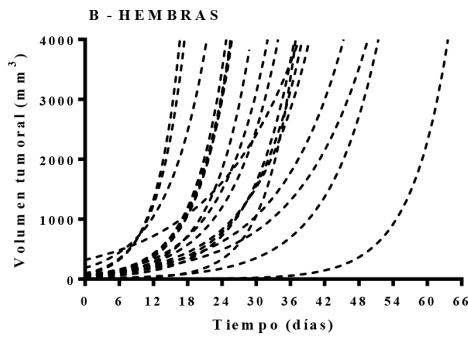
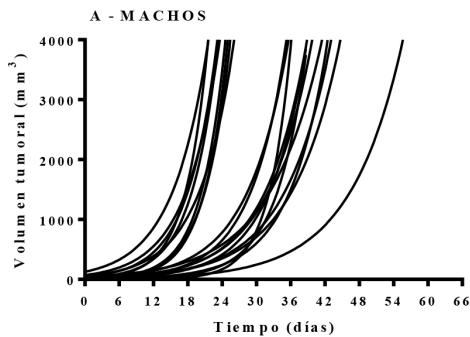
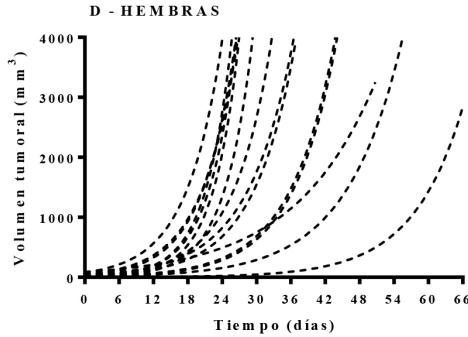
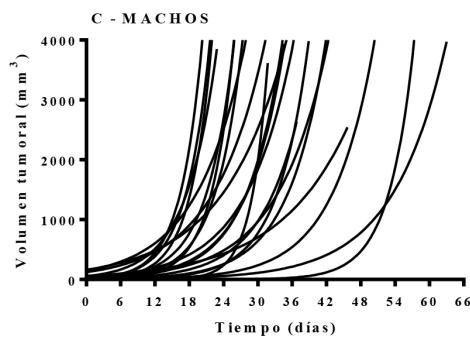


Figura 2. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en machos y hembras en los híbridos recíprocos.

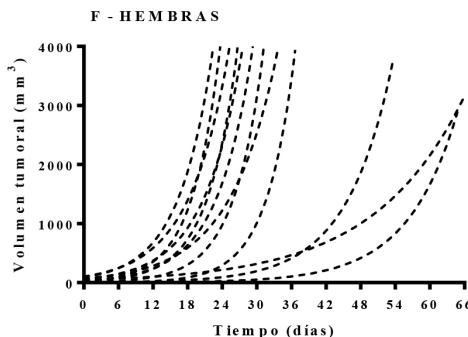
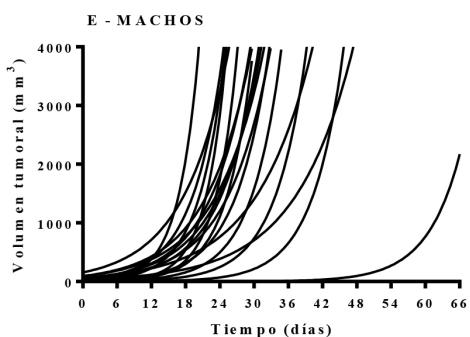
F 2 A



F 2 B



F 2 C



F 2 D

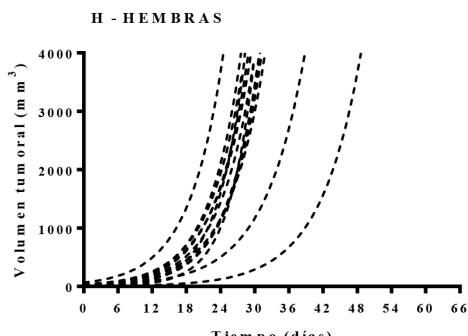
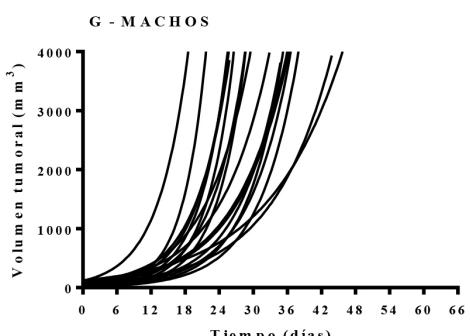


Figura 3. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en machos y hembras de las cuatro combinaciones F2

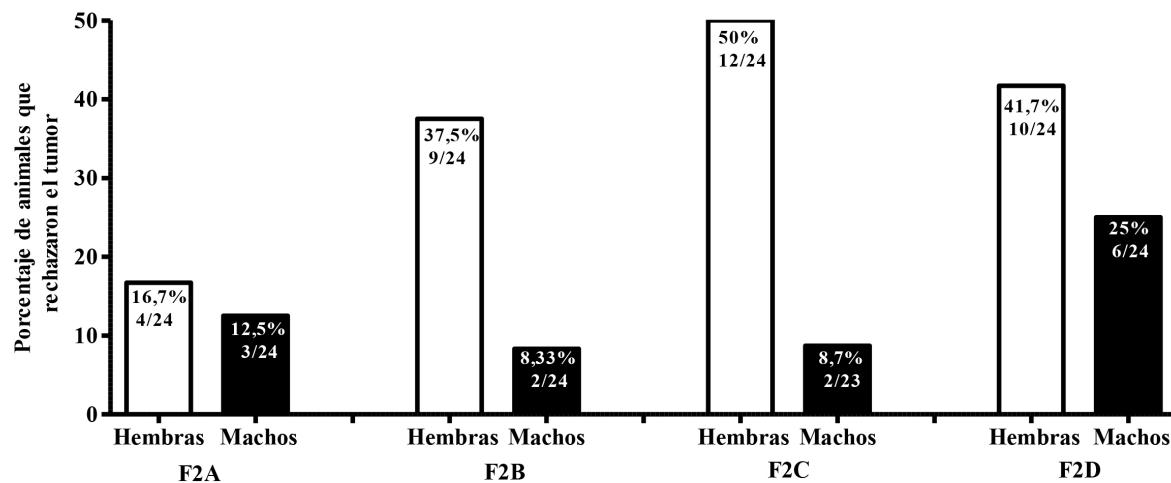


Figura 4. Proporción de animales que rechazan el adenocarcinoma de mama M-4o6 en las cuatro combinaciones F2, discriminados por sexo

Tabla 2. Tiempo medio de duplicación tumoral en las líneas parentales y en las diferentes combinaciones F1 y F2

Grupo genético	Sexo	Tiempo medio de duplicación (TdT) (media aritmética ± error estándar)
CBi	Machos	3,35 ± 0,204
CBi	Hembras	3,16 ± 0,214
F1A (CBi x CBi ⁻)	Machos	3,24 ± 0,239
F1A (CBi x CBi ⁻)	Hembras	3,78 ± 0,187
F1B (CBi ⁻ x CBi)	Machos	3,22 ± 0,309
F1B (CBi ⁻ x CBi)	Hembras	3,51 ± 0,267
F1 total	Machos	4,57 ± 0,173
F1 total	Hembras	4,85 ± 0,221
F2A (CBi ⁻ x CBi) x (CBi ⁻ x CBi)	Machos	4,27 ± 0,255
F2A (CBi ⁻ x CBi) x (CBi ⁻ x CBi)	Hembras	5,34 ± 0,438
F2B (CBi ⁻ x CBi) x (CBi x CBi ⁻)	Machos	4,51 ± 0,373
F2B (CBi ⁻ x CBi) x (CBi x CBi ⁻)	Hembras	4,91 ± 0,449
F2C (CBi x CBi ⁻) x (CBi ⁻ x CBi)	Machos	4,61 ± 0,382
F2C (CBi x CBi ⁻) x (CBi ⁻ x CBi)	Hembras	4,95 ± 0,596
F2D (CBi x CBi ⁻) x (CBi x CBi ⁻)	Machos	4,85 ± 0,378
F2D (CBi x CBi ⁻) x (CBi x CBi ⁻)	Hembras	4,04 ± 0,144
F2 total	Machos	4,55 ± 0,173
F2 total	Hembras	4,85 ± 0,221

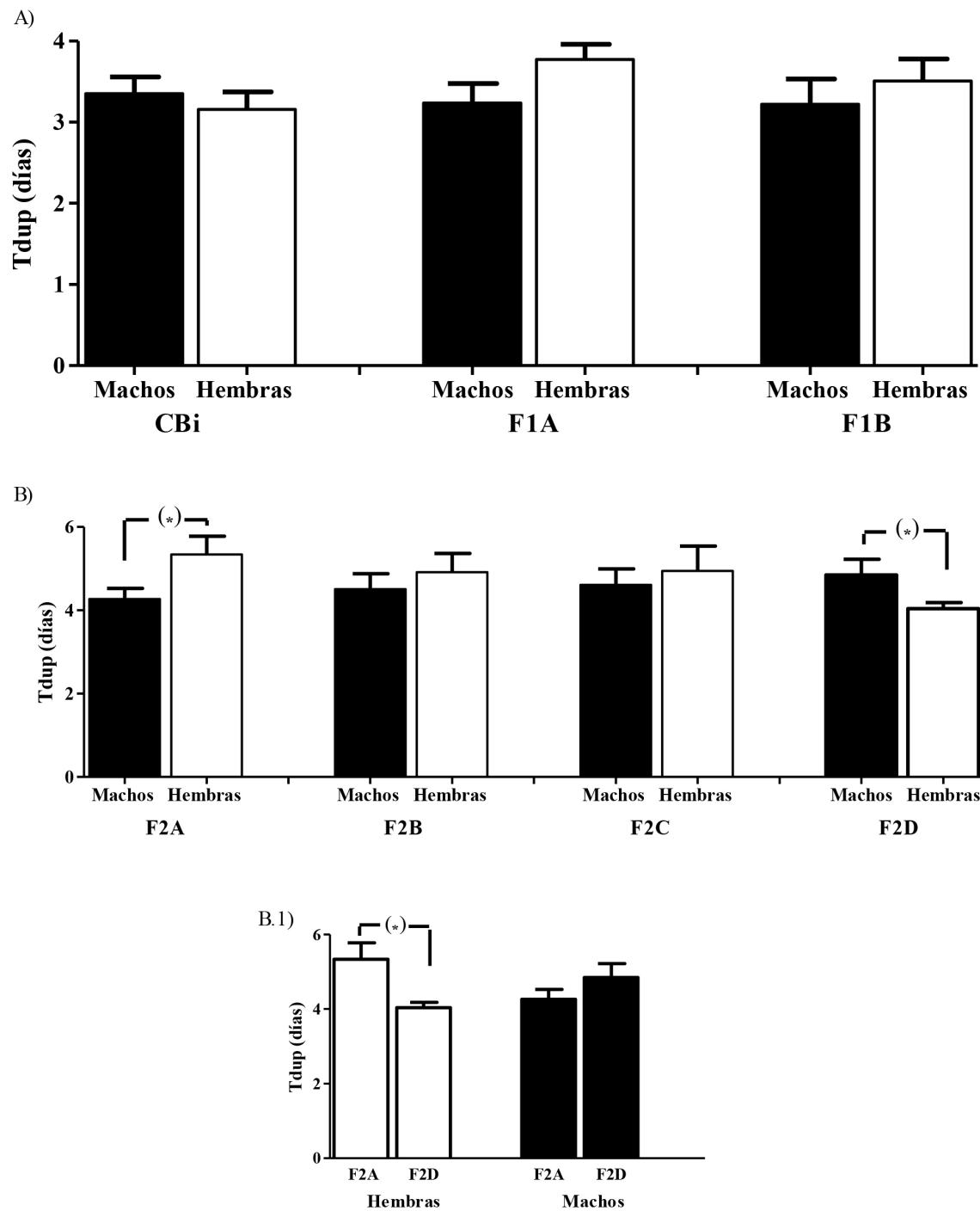


Figura 5. Tiempo medio de duplicación tumoral en la línea parental CBi, en los híbridos recíprocos y en las cuatro combinaciones F₂

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una patología de la cual se dispone de abundante información tanto sobre la enfermedad en general como sobre las posibles modalidades de herencia, pero aún queda mucho por dilucidar respecto del papel que juegan los diferentes genes implicados en la susceptibilidad/resistencia a la misma (Schoeps *et al.*, 2014). La información derivada de la utilización de modelos animales puede ser una herramienta de trascendencia en la medida en que el enfoque genómico comparativo posibilite extrapolar a la población humana los avances en el conocimiento de los genes que controlan el cáncer de mama en dichos modelos (Aitman *et al.*, 2011). Las líneas de ratón utilizadas en este trabajo presentan comportamientos extremos contrastantes frente al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406. Mientras en la línea CBi, el adenocarcinoma M-406 crece en forma exponencial en el 100 % de los animales desafiados, en la línea CBi⁻ el mismo es rechazado en el 100 % de los casos, comportamiento que permite considerar a la línea CBi como un fenotipo susceptible y a la línea CBi⁻ como un fenotipo resistente. La respuesta de los híbridos recíprocos, similar a la observada en la línea parental CBi, junto con la segregación del carácter en la F₂ permite concluir que, aún admitiendo una base poligénica para los fenómenos de susceptibilidad y resistencia involucrados en este modelo, la línea CBi sería portadora de alelos de susceptibilidad, en tanto posibilitan el crecimiento de M-406, mientras que la línea CBi⁻ portaría alelos de resistencia cuya expresión llevan al rechazo tumoral. La respuesta observada es compatible con el comportamiento de la resistencia/susceptibilidad como un carácter umbral, hipótesis formulada recientemente para explicar la respuesta de la línea CBi/L derivada del mismo experimento de selección, frente al desafío con el mismo tumor (Pagura *et al.*, 2014). La constatación de una F₂ segregante abre la posibilidad futura de identificar regiones cromosómicas (QTL) vinculadas con el crecimiento o el rechazo de este tumor, que teniendo en cuenta la proximidad genética entre los seres humanos y el ratón, podría en un futuro permitir el rastreo de regiones similares en seres humanos (Bedell *et al.*, 1997). Mediante estrategias de este tipo, a partir de cruzamientos entre ratones BALB/C susceptibles y C57BL/6 resistentes al desarrollo de tumores mamarios espontáneos, se identificó el gen Dmbt1 involucrado en la defensa inmune contra tumores (Blackburn *et al.*,

2007) y los loci Mtsm1, dominantes en la línea BALB/CJ, ligados al proceso de tumorigénesis (Koch *et al.*, 2007). Asimismo, en un modelo de carcinogénesis inducida en el que se cruzaron ratas Wistar Furth susceptibles con ratas Copenhague resistentes, se identificaron en estas últimas los loci MCS2 y MCS3 que interactúan de manera aditiva en la supresión del desarrollo de tumores mamarios y el locus MCS4 que actúa aumentando el número de carcinomas, lo que sugiere una base poligénica para la susceptibilidad a la carcinogénesis inducida en estas líneas. Coincidientemente, un polimorfismo humano homólogo a la región rata MCS4 se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama en las mujeres afroamericanas (Shepel *et al.*, 1998). A diferencia de lo observado en humanos, especie en la cual la incidencia de carcinomas mamarios en hombres es de alrededor del 0,6 % de todos los carcinomas mamarios y menor del 1 % de todas las enfermedades malignas de los varones (Giordano *et al.*, 2004; Reiner y Badve, 2012), al discriminar por sexo la susceptibilidad/resistencia en la F₂, se observó que la proporción de individuos que rechazaron el tumor fue significativamente mayor en las hembras que en los machos (33,3 % *versus* 10,4 %; P<0,0001). La modelización matemática del comportamiento dinámico del volumen tumoral en función del tiempo transcurrido desde el desafío permitió disponer de una nueva variable de utilidad para la caracterización propuesta. Mehrara sugirió la posibilidad de utilizar el tiempo medio de duplicación (TdT) como un indicador del crecimiento tumoral (Mehrara *et al.*, 2007). En este modelo el análisis de los TdT en la línea CBi y en los híbridos recíprocos no mostró diferencias significativas ni dimorfismo sexual, probablemente debido a la ausencia en el tumor de receptores hormonales (Rico *et al.*, 2012). Si bien los resultados observados en las líneas parentales y en las F1 sugieren que los genes involucrados en la susceptibilidad/resistencia al M-406 serían autosómicos y no estarían influenciados en su expresión por el sexo ni por fenómenos epigenéticos de impronta, el análisis de los TdT en las distintas combinaciones de la F₂ permitió hipotetizar cierta vinculación con los genotipos maternos, dado que la doble carga genética de origen materno CBi (susceptible) en la F₂D o CBi⁻ (resistente) en la F₂A se tradujo en una mayor o menor velocidad de crecimiento tumoral respectivamente, respuesta no evidenciada en las dos combinaciones (F₂B y F₂C) restantes. Esta respuesta diferencial sólo fue observada en hembras [F₂A>F₂D

(P=0,019)] hecho que permite especular acerca de la existencia de fenómenos epigenéticos relacionados con el sexo del portador del tumor.

Se puede concluir que en este modelo el proceso de selección artificial junto con la acción de procesos simultáneos de deriva y/o mutación genética, han generado diferencias determinantes de los fenotipos de susceptibilidad y resistencia ante el desafío con este adenocarcinoma trasplantable de mama, triple negativo. Los estudios realizados aplicando la metodología mendeliana clásica, indican que el fenotipo susceptible es dominante frente al resistente y están asociados a procesos epigenéticos.

En un reciente editorial de la revista Nature (Anonymous, 2014) a la vez que se remarca la utilidad de los ratones *knock-out* como herramientas para la comprensión de las alteraciones a nivel celular que tienen lugar en procesos patológicos tales como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer, también se mencionan las limitaciones de este enfoque. En este sentido se enfatiza que considerar que la manipulación de un gen o dos puede reproducir la complejidad de una enfermedad multifactorial en una especie diferente es una de las razones por las cuales las terapias que “curan” a los ratones mutantes luego fracasan en la clínica y llevan al descrédito al modelo en cuestión. De acuerdo con Balling (2007) la modelización del comportamiento de los sistemas biológicos complejos representa un desafío para la biología actual. Dado que la identificación de sus componentes mediante las tecnologías “ómicas” constituye una estrategia insuficiente para ello, este autor propone hacer uso de un enfoque sistémico que informe respecto de la arquitectura de las redes involucradas. El conocimiento de la dinámica de esa estructura de redes requiere perturbarla para, posteriormente, poder caracterizar fenotípicamente los cambios producidos. La selección artificial constituye una antigua pero aún vigente estrategia de perturbación de los sistemas biológicos. El grupo de líneas de ratón CBl producto de un proceso selectivo a largo plazo han sido reconocidas como un recurso de utilidad para el estudio sistémico de diversos fenotipos complejos (Di Masso *et al.*, 2007; Vasconi *et al.*, 2008; Di Masso *et al.*, 2010). La resistencia/susceptibilidad ante el desafío con un tumor trasplantable de mama representa un ejemplo más en este sentido.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitman TJ., Boone C., Churchill G.A., Hengartner M.O., Mackay T.F., Stemple D.L. (2011) The future of model organisms in human disease research. *Nat. Rev. Genet.* 12: 575-582.
- Anonymous (2014) Still much to learn about mice. *Nature* 509: 399.
- Balling R. (2007) From mouse genetics to systems biology. *Mamm. Genome* 18: 383-388.
- Bedell M.A., Jenkins N.A., Copeland N.G. (1997) Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes and development.* 11: 1-10.
- Blackburn A.C., Hill L.Z., Roberts A.L., Wang J., Aud D., Jung J., Nikolcheva T., Allard J., Peltz G., Otis C.N., Cao Q.J., Ricketts R.S., Naber S.P., Mollenhauer J., Poustka A., Malamud D., Jerry D.J. (2007) Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk. *Am. J. Pathol.* 170: 2030-2041.
- Bradbury A.R., Olopade O.I. (2007) Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8: 255-267.
- Canadian Council of Animal Care (2007) Guidelines on procurement of animals used in science Ottawa, Canada, CCAC.
- Chojniak R., Younes R.N. (2003) Pulmonary metastases tumor doubling time: assessment by computed tomography. *Am. J. Clin. Oncol.* 26: 374-377.
- Collins I., Workman P. (2006) New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 2: 689-700.
- Dahlman I., Eaves I.A., Kosoy R., Morrison V.A., Heward J., Gough S.C., Allahabadia A., Franklyn J.A., Tuomilehto J., Tuomilehto-Wolf E., Cucca F., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Stevens H., Carr P., Nutland S., McKinney

- P., Shield J.P., Wang W., Cordell H.J., Walker N., Todd J.A., Concannon P. (2002) Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat. Genet.* 30: 149-150.
- Di Masso R.J., Abdala S.B., Sánchez S.M., Font M.T. (1991) Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana* 9: 79-82.
- Di Masso R.J., Pippa C., Silva P.S., Font M.T. (2010) Componentes principales como fenotipos de sistemas biológicos complejos. Relación músculo-hueso en el ratón (*Mus musculus*). *BAG J. Basic Appl. Genet.* 21: 10.
- Di Masso R.J., Zerpa C.M., Silva P.S., Font M.T. (2007) Femoral morphometry and femur length in mice selected for different body conformations. A potential animal model suitable for QTLs mapping. *Arch. Tierz.* 50: 10.
- El Sharouni S.Y., Kal H.B., Battermann J.J. (2003) Accelerated regrowth of non-small-cell lung tumours after induction chemotherapy. *Br. J. Cancer* 89: 2184-2189.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (2001) Introducción a la Genética Cuantitativa. Acribia Editorial, Zaragoza, España.
- Foulkes W.D. (2008) Inherited susceptibility to common cancers. *N. Engl. J. Med.* 359: 2143-2153.
- Giordano S.H., Cohen D.S., Buzdar A.U., Perkins G., Hortobagyi G.N. (2004) Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer* 101: 51-57.
- Gould M.N. (1995) Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 6: 147-152.
- Hinrichsen L.I., Di Masso R.J. (2010) Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *BAG J. Basic Appl. Genet.* 21: 7-19.
- Koch J.G., Gu X., Han Y., El-Naggar A.K., Olson M.V., Medina D., Jerry D.J., Blackburn A.C., Peltz G., Amos C.I., Lozano G. (2007) Mammary tumor modifiers in BALB/cJ mice heterozygous for p53. *Mamm. Genome* 18: 300-309.
- Leamy L.J., Gordon R.R., Pomp D. (2012) Epistatic Control of Mammary Cancer Susceptibility in Mice may Depend on the Dietary Environment. *Heredity Genet.* 1: 108.
- Mehrara E., Forssell-Aronsson E., Ahlman H., Bernhardt P. (2007) Specific growth rate versus doubling time for quantitative characterization of tumor growth rate. *Cancer Res.* 67: 3970-3975.
- Pagura L., Caceres J.M., Cardinale A., Scharovsky O.G., Di Masso R.J., Zacarias-Fluck M.F., Rico M.J., Rozados V.R. (2014) A mammary adenocarcinoma murine model suitable for the study of cancer immunoediting. *J. Biomed. Sci.* 21: 52.
- Reiner A., Badve S. (2012) Carcinoma of the male breast. IARC Press.
- Rico M.J., Roggero E.A., Scharovsky O.G., Di Masso R.J., Rozados V.R. (2012) Avances en la caracterización de un modelo murino de cáncer de mama a partir del estudio de los receptores de progesterona, estrógenos y Her2/neu. Jornadas de Divulgación técnico-científica, Casilda, Santa Fe, UNR editora.
- Sawyers C. (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294-297.
- Schoeps A., Rudolph A., Seibold P., Dunning A.M., Milne R.L., Bojesen S.E., Swerdlow A., Andrulis I., Brenner H., Behrens S., Orr N., Jones M., Ashworth A., Li J., Cramp H., Connley D., Czene K., Darabi H., Chanock S.J., Lissowska J., Figueroa J.D., Knight J., Glendon G., Mulligan A.M., Dumont M., Severi G., Baglietto L., Olson J., Vachon C., Purrington K., Moisse M., Neven P., Wildiers H., Spurdle A., Kosma V.M., Kataja V., Hartikainen J.M., Hamann U., Ko Y.D., Dieffenbach A.K., Arndt V., Stegmaier C., Malats N., Arias Perez J.I., Benitez J., Flyger H., Nordestgaard B.G., Truong T., Cordina-Duverger E., Menegaux F., dos Santos Silva I., Fletcher O., Johnson N., Haberle L., Beckmann M.W., Ekici A.B., Braaf L., Atsma F., van den Broek A.J., Makalic E., Schmidt D.F., Southey M.C., Cox A., Simard J., Giles G.G., Lambrechts D., Mannermaa A., Brauch H., Guelen P., Peto J., Fasching P.A., Hopper J., Flesch-Janys D., Couch F., Chenevix-Trench G., Pharoah P.D., Garcia-Closas M., Schmidt M.K., Hall P., Easton D.F.,

- Chang-Claude J. (2014) Identification of new genetic susceptibility loci for breast cancer through consideration of gene-environment interactions. *Genet. Epidemiol.* 38: 84-93.
- Shepel L.A., Lan H., Haag J.D., Brasic G.M., Gheen M.E., Simon J.S., Hoff P., Newton M.A., Gould M.N. (1998) Genetic identification of multiple loci that control breast cancer susceptibility in the rat. *Genetics* 149: 289-299.
- Squartini F., Pingitore R. (1994) Tumours of the mammary gland. IARC scientific publications, pp. 47-100.
- Sztereday Z., Schally A.V., Nagy A., Plonowski A., Bajo A.M., Halmos G., Szepeshazi K., Groot K. (2002) Effective treatment of experimental U-87MG human glioblastoma in nude mice with a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215. *Br. J. Cancer* 86: 1322-1327.
- Szpirer C., Szpirer J. (2007) Mammary cancer susceptibility: human genes and rodent models. *Mamm. Genome* 18: 817-831.
- Usuda K., Saito Y., Sagawa M., Sato M., Kanma K., Takahashi S., Endo C., Chen Y., Sakurada A., Fujimura S. (1994) Tumor doubling time and prognostic assessment of patients with primary lung cancer. *Cancer* 74: 2239-2244.
- Vasconi M.D., Malfante P., Bassi A., Giudici C., Revelli S., Di Masso R., Font M.T., Hinrichsen L. (2008) Phenotypic differences on the outcome of the host-parasite relationship: behavior of mice of the CBi stock in natural and experimental infections. *Vet. Parasitol.* 153: 157-163.
- Viniegra M. Cáncer de mama en Argentina : organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control (2010) <http://www.msal.gov.ar/inc> (accessed mayo 2014).
- Workman P., de Bono J. (2008) Targeted therapeutics for cancer treatment: major progress towards personalised molecular medicine. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8: 359-362.
- Zacarias Fluck M.F., Hess L., Salatino M., Croci D.O., Stupirski J.C., Di Masso R.J., Roggero E., Rabinovich G.A., Scharovsky O.G. (2012) The aggressiveness of murine lymphomas selected in vivo by growth rate correlates with galectin-1 expression and response to cyclophosphamide. *Cancer Immunol. Immunother.* 61: 469-480.



BAG
Journal of Basic & Applied Genetics