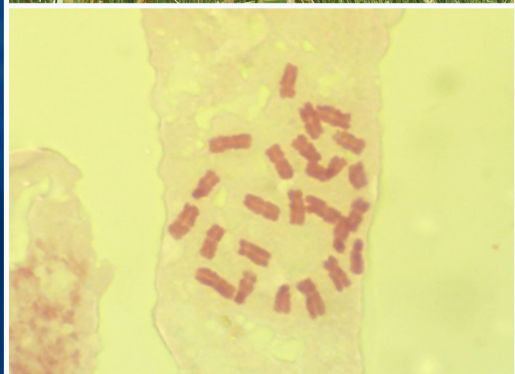




Journal of Basic & Applied Genetics

(Formerly MENDELIANA)

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



Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX
THOMSON REUTERS
SCOPUS

Included in **SciELO**



COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

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

Editores Asociados:

Citogenética Animal

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

Citogenética Humana

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

Citogenética Vegetal

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

Genética de Poblaciones y Evolución

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

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

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

Genética Humana y Genética Médica

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

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

Genética Molecular (Animal)

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

Genética Molecular (Vegetal)

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

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

Genética y Mejoramiento Animal

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

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

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal

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

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

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

Mutagénesis

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

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal

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

Consultor Estadístico:

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

ÍNDICE

5 - 8

Article 1 - opinion

NEXT-GENERATION PHENOTYPING IN PLANTS:
OLD PROBLEMS, NEW PROMISES

FENOTIPIFICACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN
EN PLANTAS: VIEJOS PROBLEMAS, NUEVAS
PROMESAS

Breccia G., Nestares G.

9 - 20

Article 2 - research

DEVELOPMENT OF SOYA GERMPLASM
WITHOUT LIPOXIGENASES AND
ANTINUTRITIONAL FACTORS

DESARROLLO DE GERMOPLASMA DE
SOJA SIN LIPOXIGENASAS Y FACTORES
ANTINUTRICIONALES

Di Renzo M.A., Bonamico N.C., Bologna S.B., Rojas E.,
Soldini D.O., Gilli J.R., Sequin L., Martínez Alvarez D.L.

21 - 30

Article 3 - research

GENOTYPIC ANALYSIS OF C677T AND A1298C
POLYMORPHISMS IN THE METHYLENE
TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE AND
A66G POLYMORPHISM IN THE METHIONINE
SINTASE REDUCTASE GENE IN DOWN
SYNDROME

ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LOS
POLIMORFISMOS C677T Y A1298C EN EL
GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO
REDUCTASA Y EL POLIMORFISMO A66G EN EL
GEN DE METIONINA SINTASA REDUCTASA EN
SÍNDROME DE DOWN

Rengifo Ramos L., Gaviria Arias D.

31 - 40

Article 4 - research

ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS
AND THEIR UTILITY IN SELECTION FOR SEED
PRODUCTION IN *Phalaris Aquatica* L.

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS
Y SU UTILIDAD PARA LA SELECCIÓN POR
PRODUCCIÓN DE SEMILLA EN *Phalaris*
Aquatica L.

Spara, F., Abbott, L., Wolff, R., Vernengo, E.

41 - 44

Article 5 - opinion

IS THE GENETIC INTEGRITY OF NATURAL
PLANT POPULATIONS *EX SITU* PRESERVED
WITH THE CURRENT SAMPLING,
CONSERVATION AND REGENERATION
APPROACHES?

LA INTEGRIDAD GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES NATURALES DE PLANTAS ¿SE
PRESERVA *EX SITU* CON LOS ENFOQUES
CORRIENTES DE MUESTREO, CONSERVACIÓN
Y REGENERACIÓN?

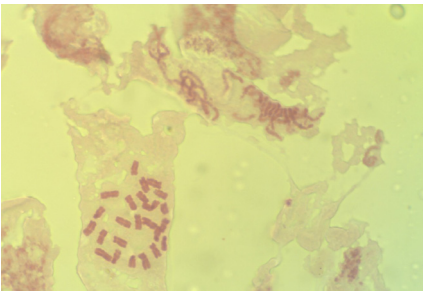
Camadro, E.L.

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Tapa



Panojas de *Phalaris aquatica* L. (falaris)
Autor: F. Spara



Metafase mitótica en *Solanum glaucophyllum* (duraznillo)
Autor: D. Pérez



Cultivo de soja (*Glycine max*)
Autor: S. Bologna

NEXT-GENERATION PHENOTYPING IN PLANTS: OLD PROBLEMS, NEW PROMISES

FENOTIPIFICACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN EN PLANTAS: VIEJOS PROBLEMAS, NUEVAS PROMESAS

Breccia G. ^{1,2}, Nestares G. ¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Campo Experimental Villarino,
CC14 S2125ZAA, Santa Fe, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

gbreccia@unr.edu.ar

ABSTRACT

Current progress in DNA sequencing technology has enabled to gather a large amount of genomic information. Genotyping has become a routine activity with lower costs as new technology emerges. However, genomic information cannot provide much insight into how a given genotype performs. In fact, improvement in understanding phenotypes and the ability to generate good phenotypic data became essential for better utilization of genotypic data and understanding the effect of environment. In this post-genomic era, phenomics emerge as a new discipline that aims the acquisition of high-throughput phenotypic information at all levels of biological organization integrating different “omics” data. New technology in plant phenotyping comprises a wide range of complexity including image analyzing softwares, large-scale platforms and field-phenotyping systems. The increasingly number of tools for accurate phenotyping as well as the advantages and opportunities for plant sciences are being discussed.

Key words: crop breeding, high-throughput phenotyping, image analysis

RESUMEN

Los rápidos avances en la tecnología de secuenciación de ADN han permitido obtener una gran cantidad de información a nivel genómico. Actualmente, el principal interés se ha desplazado hacia el estudio del fenotipo con la expectativa de que los progresos en los sistemas de fenotipado puedan aumentar nuestro conocimiento de las relaciones genotipo-fenotipo-ambiente. En esta era post-genómica, la fenómica emerge como una nueva disciplina que integra las demás “ómicas” y busca la adquisición de información en todos los niveles de la organización biológica. En este sentido, las nuevas tecnologías abarcan un amplio rango de complejidad incluyendo programas para el análisis digital de imágenes, plataformas de fenotipado a gran escala y sistemas de fenotipado a campo. En el presente trabajo se discute la importancia de contar con herramientas para la determinación precisa de fenotipos y las oportunidades que las mismas ofrecen para el mejoramiento vegetal.

Palabras clave: mejoramiento vegetal, fenotipado de alto rendimiento, análisis de imágenes

Fecha de recepción: 20/11/2013
Fecha de aceptación de versión final: 30/01/2014

Genotyping and sequencing technologies were developed a few decades ago and now are available in a high-throughput manner at relatively low cost. Genomes of several organisms have been sequenced and genomic information is publicly accessible through different databases. Genomic analyses have been successful but considerable efforts are still necessary to make sense and exploit genetic information.

Phenotyping methods have lagged behind genomics. Most of phenotypic information lacks automation and precision. The large amount of genomic information needs to be put into phenotypic and breeding context in order to understand gene function and to be useful in plant breeding. For that reason, a fundamental change in research is needed to address the deficiency of phenotypic information. In this way, phenotyping has become the major bottleneck (Furbanck and Tester, 2011; Cobb *et al.*, 2013).

Nowadays, it is considered that the discovery of new genes and the revelation of complex interactions will be possible thanks to the development of accurate phenotyping technology. The search in PubMed database for *plant phenotyping* (accessed on September 2013) retrieved more than 400 results and, from those, 300 were studies published in the last five years. A new paradigm with focus on phenotyping has emerged in plant research, particularly in the area of genomics, physiology and breeding. Currently, advances have been made in high-throughput and non-invasive techniques at whole-plant level while phenotyping at lower levels such as organ, tissue or cell is still an artisanal work and often destructive to the sample.

The interest in high-throughput phenotyping has led to a new discipline known as phenomics, which involves the acquisition of high-dimensional phenotypic data on an organism-wide scale (Houle *et al.*, 2010). Phenomics involves the integration of other omics (transcriptomics, epigenomics, proteomics and metabolomics) and it is enabled by advances in high-throughput technology. The aim of plant phenomics is to characterize all the possible phenotypes under different environmental conditions of a given genotype. For that purpose, phenomics includes phenotyping at multiple levels of organization (ranging from cellular components to whole plants and canopy) and comprises structural, physiological, and performance-related traits (Dhondt *et al.*, 2013).

Imaging technology is a fundamental tool for gathering of high-throughput phenotype data. Digital image analysis enables the accurate acquisition of morphometric parameters that can quantify growth and shape of plant organs. Similarly, cell production and expansion can be measured from microscope images. Automatic or semiautomatic methods are necessary to replace standard manual methods to increase precision and enable population genetic studies (Spalding and Miller, 2013). Digital image analysis can be a powerful alternative to achieve a more precise phenotyping than traditional visual ranking that depends on the subjectivity of the operator. Furthermore, automation enables large-scale studies. An updated list of available image-analyzing tools can be found in www.plant-image-analysis.org (Lobet, 2013). From our experience, the implementation of this technology improved the assessment of morphology, color and enhanced accuracy in the evaluation of growth variables without increasing costs. For example, Tomato Analyzer software (Rodríguez *et al.*, 2010) provided an objective and reliable evaluation of size and color variation of sunflower leaves under herbicide treatment (Breccia *et al.*, 2012). SmartRoot software (Lobet *et al.*, 2011) was efficient in analysing root architecture of sunflower genotypes under different herbicide treatments. Primary and lateral root growth parameters were key components in characterizing root growth under herbicide application and to discriminate different degrees of herbicide resistance.

Hardware, imaging, software, and analysis tools are used in the development of phenotyping platforms. There are various examples of successful automated systems in controlled conditions for measuring aboveground traits (e.g. Pereyra-Irujo *et al.*, 2012; Tisné *et al.*, 2013), root architecture (e.g. Famoso *et al.*, 2010; Clarck *et al.*, 2011) and both shoot and root growth (e.g. Ruts *et al.*, 2013). Field-phenotyping initiatives are also developed using proximal sensing devices (e.g. Busemeyer *et al.*, 2013). Infrared imagery, stereo image analysis, acoustic-based distance sensing, non-contact measurement of chlorophyll fluorescence, laser distance sensing and near infrared spectroscopy are potential tools to obtain phenomic data in field conditions (White *et al.*, 2012). On the other hand, large-scale platforms for tissue or cell level-phenotyping are still undeveloped. Advances in robotic sampling of plants grown in field or greenhouse-platforms combined with automatic analysis and proper conservation of the

sample for further analysis will facilitate biochemical and histological characterization in large-scale phenotyping.

The correct determination of phenotype is of outstanding importance to unravel gene function and plant responses to several biotic and abiotic stresses. Will high-throughput technologies meet that purpose? Most of the greenhouse and laboratory-based phenotyping platforms were developed for screening abiotic (e.g. Shi *et al.*, 2013) and biotic (e.g. Chen *et al.*, 2012) stress tolerance. On the other hand, high-throughput phenotyping in mutational analysis enables the identification and characterization of gene function (Sozzani and Benfey, 2011).

A recent review describes how phenotyping tools in combination with known breeding strategies will empower crop improvement (Cobb *et al.*, 2013). In this sense, 3D-phenotyping and quantitative trait *locus* mapping allowed the identification of core regions of the rice genome controlling root architecture (Topp *et al.*, 2013). Similarly, genomic regions associated with endosperm hardness, grain density and size in barley were detected using a phenotyping platform under controlled conditions (Walker *et al.*, 2013). Field-based phenotyping allowed the dissection of the genetic architecture of biomass accumulation by a genome-wide association study in triticale (Busemeyer *et al.*, 2013).

Most of phenotypic data are virtually lost, particularly for crop performance traits. Less than 1% of 5,000 publications that report on Quantitative Trait Loci (QTL) mapping publicly provide the raw data (Zamir, 2013). The availability of phenomic data through repository public databases is an essential requirement for increasing crop yields and food production.

In conclusion, great advances in phenotyping technology give us tools to accurately measure plants characters in large-scale and will narrow the differences between genomics, plant function and agricultural traits. As Cobb *et al.* (2013) have pointed out the next generation phenotyping *will allow geneticists and breeders to productively interrogate the complex ménage à trois between genotype, phenotype and the environment*. However, will this be possible? Will a new bottleneck emerge? What else will be needed for understanding genotype-phenotype-environment relationships? We will probably not know the answers until these technologies become accessible and a large amount of phenotypic data becomes available. How to manage the complexity of phenotypic information at

different organizational levels? Concerted efforts among different areas of technology, statistics and biology will be required to address this and other coming issues.

Under this new scenario, it is necessary for plant breeders to take into account these new technologies that can precisely assess the phenotypic variability of the traits of interest in breeding programs.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Dr. María Laura Mayor for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Breccia G., Gil M., Vega T., Zorzoli R., Picardi L., Nestares G. (2012) Effect of cytochrome P450s inhibitors on imidazolinone resistance in sunflower. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina, pp. 507-512.
- Busemeyer L., Ruckelshausen A., Möller K., Melchinger A.E., Alheit K.V., Maurer H.P., Hahn V., Weissmann E.A., Reif J.C., Würschum T. (2013) Precision phenotyping of biomass accumulation in triticale reveals temporal genetic patterns of regulation. *Sci. Rep.* 3: 2442.
- Chen X., Vosman B., Visser R.G., van der Vlugt R.A., Broekgaarden C. (2012) High throughput phenotyping for aphid resistance in large plant collections. *Plant Methods* 8: 33.
- Clark R.T., MacCurdy R.B., Jung J.K., Shaff J.E., McCouch S.R., Aneshansley D.J., Kochian L.V. (2011) Three-Dimensional Root Phenotyping with a Novel Imaging and Software Platform. *Plant Physiol.* 156: 455-465.
- Cobb J.N., DeClerck G., Greenberg A., Clark R., McCouch S. (2013) Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theor. Appl. Genet.* 126: 867-887.

- Dhondt D., Wuyts N., Inze D. (2013) Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. *Trends Plant Sci.* 18: 428-439.
- Famoso A.N., Clark R.T, Shaff J.E., Craft E., McCouch S.R., Kochian L.V. (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol.* 153: 1678-1691.
- Furbank R.T., Tester M. (2011) Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci.* 16: 635-644.
- Houle D., Govindaraju D., Omholt S. (2010) Phenomics: the next challenge. *Nat. Rev. Genet.* 11: 855-866.
- Lobet G. (2013) <http://www.plant-image-analysis.org/> (accessed September 2013).
- Lobet G., Pagès L., Draye X. (2011) A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol.* 157: 29-39.
- Pereyra-Irujo G.A., Gasco E.D., Peirone L.S., Aguirrezábal L.A.N. (2012) GlyPh: a low-cost platform for phenotyping plant growth and water use. *Funct. Plant Biol.* 39: 905-913.
- Rodriguez G.R., Moysenko J.B., Robbins M.D., Morejón N.H., Francis D.M., van der Knaap E. (2010) Tomato Analyzer: A Useful Software Application to Collect Accurate and Detailed Morphological and Colorimetric Data from Two-dimensional Objects. *J. Vis. Exp.* 37: 1856.
- Ruts T., Matsubara S., Walter A. (2013) Synchronous high-resolution phenotyping of leaf and root growth in *Nicotiana tabacum* over 24-h periods with GROWMAP-plant. *Plant Methods* 9: 2.
- Shi L., Shi T., Broadley M.R., White P.J., Long Y., Meng J., Xu F., Hammond J.P. (2013) High-throughput root phenotyping screens identify genetic loci associated with root architectural traits in *Brassica napus* under contrasting phosphate availabilities. *Ann. Bot.* 112: 381-389.
- Sozzani R., Benfey P.N. (2011) High-throughput phenotyping of multicellular organisms: finding the link between genotype and phenotype. *Genome Biol.* 12: 219.
- Spalding E., Miller N. (2013) Image analysis is driving a renaissance in growth measurement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 100-104.
- Tisné S., Serrand Y., Bach L., Gilbault E., Ameur R.B., Balasse H., Voisin R., Bouchez D., Durand-Tardif M., Guerche P., Chareyron G., Da Rugna J., Camilleri C., Loudet O. (2013) Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *The Plant J.* 74: 534-544.
- Topp C.N., Iyer-Pascuzzi A.S., Anderson J.T., Lee C.R., Zurek P.R., Symonova O., Zheng Y., Bucksch A., Yuriy Mileyko Y., Galkovskiy T., Moore B.T., Harer J., Edelsbrunner H., Mitchell-Olds T., Weitz J.S., Benfey P.N. (2013) 3D phenotyping and quantitative trait locus mapping identify core regions of the rice genome controlling root architecture. *Natl. Acad. Sci. USA* 110: E1695-E1704.
- Walker C.K., Ford R., Muñoz-Amatriaín M., Panozzo J.F. (2013) The detection of QTLs in barley associated with endosperm hardness, grain density, grain size and malting quality using rapid phenotyping tools. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-013-2153-2.
- White J.W., Andrade-Sanchez P., Gore M.A., Bronson K.F., Coffelt T.A., Conley M.M., Feldmann K.A., French A.N., Heun J.T, Hunsaker D.J., Jenks M.A., Kimball B.A., Roth R.L., Strand R.J., Thorp K.R., Wall G.W., Wang G. (2012) Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crop Res.* 133: 101-112.
- Zamir D. (2013) Where have all the crop phenotypes gone? *PLoS Biol.* 11 (6) e1001595.

DEVELOPMENT OF SOYA GERMLASM WITHOUT LIPOXIGENASES AND ANTINUTRITIONAL FACTORS

DESARROLLO DE GERMOPLASMA DE SOJA SIN LIPOXIGENASAS Y FACTORES ANTINUTRICIONALES

Bologna S.B.¹, Rojas E.¹, Soldini D.O.², Gilli J.R.², Sequin L.², Martínez Alvarez D.L.¹

¹Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias
Av. 25 de Mayo 384, Villa Mercedes (San Luis)

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, E. E. A. Marcos Juárez
Ruta 12, Km 3, Marcos Juárez (Córdoba)

sbologna@hotmail.com.ar

ABSTRACT

The main objective of soybean breeding programs has been to increase the productive potential of the crop, while less effort has been made for improvement of quality-related traits of the grain. In the current context of globalization, markets are beginning to demand foods with differential qualities to offer products with nutritional value and acceptable organoleptic characteristics. With the aim of developing soya germplasm with quality attributes, the E.E.A. INTA Marcos Juárez and the National University of San Luis (UNSL) are conducting investigations to generate variability for antinutritional factors and lipoxygenases, in order to select null genotypes for these features. In 2006, in E.E.A. INTA Marcos Juárez, a biparental cross was carried out between two conventional genotypes, one triple null for lipoxygenases 1, 2 and 3 and, the other, null conventional for the trypsin inhibitor carrying the *Kti* gene that prevents accumulations of Kunitz antinutritional factors. At the Department of Agricultural Sciences, UNSL, segregating populations (F_2 - F_6) were developed and genetic parameters were estimated. Marker assisted selection (MAS) was performed to detect the absence of lipoxygenases and antinutritional factors in the progenies. Lastly, variability was explored in the selected advanced lines, which were agronomically characterized. The used genetic parameters were efficient tools for the selection of superior genotypes in the segregating populations, and the designed molecular markers facilitated the fast and efficient identification of germplasm without lipoxygenases and Kunitz antinutritional factors.

Key words: breeding, quality, soybean

RESUMEN

El principal objetivo de los programas de mejoramiento genético de soja ha sido el incremento del potencial productivo en tanto que se han dedicado menores esfuerzos al mejoramiento de las características que definen la calidad del grano. En el actual marco de globalización, los mercados comienzan a demandar alimentos con calidad diferencial para ofrecer productos con valor nutritivo y con características organolépticas aceptables. Con el objetivo de desarrollar germoplasma de soja con atributos de calidad, la E.E.A. INTA Marcos Juárez y la Universidad Nacional de San Luis (UNSL) llevan a cabo investigaciones que generan variabilidad para factores antinutricionales y lipoxigenasas, a fin de seleccionar genotipos nulos para dichos caracteres. En el año 2006, en la E.E.A. INTA Marcos Juárez se realizó un cruzamiento biparental entre un genotipo convencional -triple nulo para lipoxigenasas 1, 2 y 3- y una línea convencional nula para el inhibidor de la tripsina, portadora del gen *Kti* que previene la acumulación de los factores antinutricionales Kunitz. En el Departamento de Ciencias Agropecuarias de la UNSL, se desarrollaron poblaciones segregantes (F_2 - F_6) y se estimaron parámetros genéticos. Se realizó selección asistida por marcadores moleculares (MAS) para detectar la ausencia de lipoxigenasas y factores antinutricionales. Por último se exploró la variabilidad en las líneas avanzadas seleccionadas y se las caracterizó agrónomicamente. Los parámetros genéticos utilizados fueron eficientes herramientas para la selección de genotipos superiores en las poblaciones segregantes y la utilización de los marcadores moleculares diseñados facilitó la identificación rápida y eficiente de germoplasma sin lipoxigenasas y factores antinutricionales Kunitz.

Palabras clave: mejoramiento genético, calidad, soja

Fecha de recepción: 13/10/2013
Fecha de aceptación de versión final: 28/03/2014

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo que en la Argentina se desarrolla la agricultura para la producción de granos, como materia prima de uso directo o indirecto a través de sus derivados industriales. En las últimas décadas la evolución tecnológica relacionada con semillas, maquinarias y manejo del cultivo, sumada a las condiciones climáticas y edáficas, han promovido la intensificación y expansión de esta actividad.

El cultivo de la soja ha experimentado una expansión cuantitativa que, en términos de competitividad internacional demanda una expansión cualitativa basada en la producción de sojas especiales para nichos de mercados de materias primas con calidad diferencial (Soldini, 2004).

El consumo de alimentos de soja ha presentado un importante aumento en los últimos años, motivado fundamentalmente por la promoción de la calidad nutritiva del grano. Sin embargo, la mayoría de las variedades comerciales de soja no son adecuadas para la producción de alimentos porque presentan limitaciones en propiedades físicas, químicas o nutricionales. En consecuencia, la disponibilidad de variedades con atributos de calidad es prácticamente nula.

Los objetivos del mejoramiento genético se han ido redefiniendo para responder a las tendencias del mercado internacional, que marcan una creciente exigencia en la calidad nutricional en el sabor del grano y en el contenido de componentes nutraceuticos. Así se realiza selección para incrementar el contenido de proteínas, modificar el perfil de ácidos grasos, aumentar el contenido de isoflavonas, eliminar las lipoxigenasas, reducir los factores alergénicos, reducir el contenido de factores antinutricionales e incrementar el porcentaje de metionina, entre otros (Vicentini *et al.*, 2009).

La soja cruda no puede ser utilizada como alimento para animales monogástricos debido a la presencia de factores antinutricionales (FAN). Uno de ellos es, el factor Kunitz (SKTI), el cual inhibe fuertemente la tripsina produciendo una disminución de la digestión y absorción de los alimentos (Armour *et al.*, 1998). Otro efecto de este FAN es la inducción de una hipersecreción de enzimas pancreáticas y una rápida estimulación del crecimiento del páncreas, lo cual es conocido como hipertrofia e hiperplasia pancreática (Liener, 1995). El genoma de la soja contiene al menos diez genes diferentes para SKTI, los cuales son expresados diferencialmente durante el ciclo de la planta. El gen *Kti3* codifica el SKTI predominante en semillas de

soja. Se ha descubierto una mutación recesiva (*k_{ti}*) provocada por una sustitución y dos deleciones que alteran el proceso de traducción de la secuencia del alelo recesivo y evita la acumulación de SKTI en las semillas (Jofuku *et al.*, 1989).

Por otro lado, la aceptación y palatabilidad del grano están condicionadas por el sabor amargo y astringente, producido en parte por compuestos que son el resultado de la acción enzimática de las lipoxigenasas. Estas enzimas catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y constituyen cerca de 1 % del total de las proteínas presentes en el grano de soja (Siedow, 1991). Las semillas de soja contienen tres tipos de lipoxigenasas L-1, L-2 y L-3 controladas por tres genes *Lx1*, *Lx2* y *Lx3*, y la ausencia de cada enzima está determinada por los alelos nulos *lx1*, *lx2* y *lx3* (Axelrod *et al.*, 1981).

Con el objetivo de desarrollar germoplasma de soja con atributos de calidad, la EEA INTA Marcos Juárez y la UNSL, desarrollan investigaciones que generan variabilidad para factores antinutricionales y lipoxigenasas a fin deseleccionar genotipos nulos para dichos caracteres. En este marco se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estimar parámetros genéticos, coeficientes de correlación, y realizar el análisis de sendero en poblaciones segregantes;
- Realizar selección asistida por marcadores moleculares para detectar la ausencia de lipoxigenasas y factores antinutricionales;
- Explorar la variabilidad en las líneas avanzadas y caracterizarlas agronómicamente para seleccionar germoplasma de soja con atributos de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la campaña 2006/07, en la E.E.A. INTA Marcos Juárez se realizaron cruzamientos biparentales de germoplasma adaptado y exótico entre los genotipos BRM92-6600 y PI 542.044 (L81-4590).

BRM 92-6600 es un genotipo convencional, triple nulo para lipoxigenasas 1, 2 y 3, portador de los alelos *lx1*, *lx2* y *lx3* que regulan la ausencia de las lipoxigenasas y PI 542.044 (L81-4590) es una línea convencional, nula para el inhibidor de la tripsina, portador del gen *Kti* que previene la acumulación de los factores antinutricionales Kunitz.

En el invierno del 2007, la población F₁ se avanzó en invernáculo con control de temperatura, foto período y humedad.

Por otro lado, en el Departamento de Ciencias Agropecuarias de la UNSL, en la ciudad de Villa Mercedes (San Luis), se desarrollaron las poblaciones segregantes (F_2 - F_6) y se condujeron por el método de endocría “*Single Seed-Descent*” (Descendencia de una Sola Semilla) en su versión modificada “*Multiple Seed Descent*” (Descendencia de Múltiples Semillas).

En la campaña 2007/08, se sembró la población F_2 en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con dos repeticiones. Se registraron los estados fenológicos VE (emergencia) y R1 (inicio de floración) según la escala de Fehr *et al.* (1971) y se determinó el número de días a floración (NDF) y la altura de planta en cm. (AP). En el Laboratorio de Semillas y Granos de la UNSL, se obtuvo la productividad de granos ajustada a 13 % de humedad en gramos/planta (RTO), número de vainas/planta (NV) y el número de semillas/planta (NS).

Se estimó la varianza fenotípica (VF) y sus componentes a partir de la evaluación de la varianza ambiental (VE) incidente en la varianza fenotípica poblacional, mediante un análisis de la varianza (Tabla 1), en el cual k_1 genotipos escogidos aleatoriamente de la población base se evaluaron en el DCA, de manera que cada genotipo estuvo repetido k_2 veces. El modelo genético-estadístico fue el siguiente: $Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$ donde:

Y_{ij} = es la observación que corresponde al genotipo G_i en la j -ésima medición.

μ = es la media poblacional.

G_i = efecto del genotipo i .

E_{ij} = el error de la observación.

(Steel y Torrie, 1985)

Se consideró que V_2 es una estimación de la varianza ambiental promedio en la población. Entonces, la varianza genotípica poblacional (VG) puede estimarse a partir de la varianza observacional, consecuencia de la partición en el análisis de la varianza según: $VG = V_1 - V_2 / k_2$

Se estimó el coeficiente de heredabilidad (h^2) en sentido amplio según el modelo:

$h^2 = VG / VF$, a partir del Método de Componentes de Varianza

$$h^2 = (V_1 - V_2 / k_2) / (V_1 - V_2 / k_2) + V_2$$

(Kempthorne, 1973)

Se calcularon los coeficientes de correlación simple de Pearson (r) y los Coeficientes de Sendero (*Path Analysis*) y se realizó la primera selección individual de plantas.

En la campaña 2008/09 se sembró la descendencia de cada planta F_2 seleccionada (familias F_3) y se evaluaron 81 progenies en un diseño en bloques al azar con dos repeticiones. Se registraron los estados fenológicos VE, R1 y R8 (madurez comercial) y se determinó NDF, NDM (número de días a madurez), AP, NV y RTO. Se realizó el análisis genético estimando VE, VG, VE y h^2 y la selección entre y dentro de las familias.

En la campaña 2009/10 se avanzaron a campo las líneas F_4 y se realizó la segunda selección entre y dentro de las familias.

Las semillas F_5 de 128 líneas se sembraron en invernáculo para obtener material vegetal y realizar la extracción de ADN a partir de tejido foliar siguiendo el protocolo de Wining y Langridge (1991).

En el Laboratorio de Biotecnología de la E.E.A. INTA Marcos Juárez, se diseñaron marcadores moleculares funcionales codominantes para el gen *Kti* y los genes ligados *Lx1/Lx2* (Sequin *et al.*, 2008) y un marcador dominante que selecciona genotipos con al menos una copia del alelo *lx3* (Sequin, 2009). Los marcadores moleculares para las características *Lx1/Lx2*, *Lx3* y *Kti* fueron analizados siguiendo el protocolo previamente mencionado de Sequin *et al.* (2008) y de Sequin (2009).

En la campaña 2010/11 se realizó la selección asistida por los marcadores moleculares. Las familias F_5 seleccionadas se sembraron en el campo con la finalidad de avanzar una generación y obtener un volumen suficiente de semilla para iniciar la evaluación agronómica de las líneas avanzadas.

Tabla 1. Fuente de variación correspondiente al Análisis de la Varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Varianzas (V)
Entre genotipos	$k_1 - 1$	V_1
Dentro de genotipos	$k_1(k_2 - 1)$	V_2

k_1 : número de genotipos, k_2 : número de repeticiones, V_1 : varianza 1, V_2 : varianza 2.

Para caracterizar agronómicamente las líneas avanzadas, en la campaña 2011/12 se realizaron los ensayos preliminares y comparativos de rendimiento en un diseño experimental con bloques al azar con dos repeticiones. Se evaluaron 12 líneas F₆ y tres testigos de los grupos de madurez (GM) III largo (SPS3900), IV corto (P94B73) y V medio (FN545) (Tabla 2).

A partir de las variables RTO, peso de 100 semillas (PS), AP, NDF y NDM, se realizaron análisis de la varianza con test de Tuckey y análisis de componentes principales para caracterizar las líneas agronómicamente y explorar la variabilidad para las mencionadas variables. A los efectos de clasificar los genotipos en base a las variables fenológicas, se realizó un análisis de conglomerados utilizando como medida de proximidad la distancia Euclídea.

Tabla 2. Líneas F6 y testigos.

Líneas y testigos	Características
1542.2	<i>lx2, lx3, kti</i>
1513.2	<i>lx2, lx3, kti</i>
1554.2	<i>lx2, lx3, kti</i>
1580.1	<i>lx2, lx3, kti</i>
1535.1	<i>lx2, lx3, kti</i>
1558.2	<i>lx2, lx3, kti</i>
1560.2	<i>lx2, lx3</i>
1579.2	<i>lx2, lx3</i>
1528.1	<i>lx2, lx3</i>
1534.2	<i>lx2, lx3</i>
1527.1	<i>lx2, lx3</i>
1512.1	<i>lx2, lx3</i>
SPS3900	GM III largo
P94B73	GM IV corto
FN545	GM V medio

lx2: alelo recesivo lipoxigenasa 2, *lx3*: alelo recesivo lipoxigenasa 3, *kti*: alelo recesivo factor antinutricional Kunitz, GM: grupo de madurez

Los valores de medias correspondientes a todos los caracteres evaluados se analizaron estadísticamente con el programa InfoGen/P Versión 2008 (Balzarini y Di Rienzo, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la población F_2 el análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre los genotipos para todas las variables, excepto para RTO que mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 3). Estas diferencias indican que existe un potencial de variabilidad que posibilitará una selección efectiva para los caracteres relacionados con la productividad como NV, NS y RTO.

Las varianzas fenotípicas, genotípicas y ambientales, y los coeficientes de heredabilidad de todos los caracteres evaluados se presentan en la Tabla 4. En general se obtuvieron valores de heredabilidad altos para los caracteres relacionados con la productividad. Otros autores (Morceli *et al.*, 2006; Sarti *et al.*, 2006) han reportado valores similares en poblaciones

Tabla 3. Cuadrados medios y valores de F de la población F_2 .

FV	NDF	F	AP	F	NV	F	NS	F	RTO	F
Entre genotipos	58,20	4,31**	22,32	4,31**	292,20	8,25**	41,08	8,34**	2,42	2,92*
Dentro de genotipos	13,49		5,17		35,43		4,92		0,83	

** $p < 0,01$. * $p < 0,05$. NDF: número de días a floración, AP: altura de planta, NV: número de vainas/planta, NS: número de semillas/vaina, RTO: rendimiento de grano.

segregantes de soja, aduciendo que dichos resultados se deben a la alta varianza genotípica y a la superioridad de algunos genotipos en relación a la media de la población. Los resultados obtenidos también coinciden con los informados por Bologna *et al.* (2009b), quienes en una población F_2 de soja con atributos de alto contenido de proteína, estimaron valores de heredabilidad en sentido amplio para RTO y NS superiores a 50 %.

Tabla 4. Parámetros genéticos de la población F_2 .

Variables	VG	VE	VF	h^2
NDF	22,35	13,49	35,84	62
AP	8,57	5,17	13,74	62
NV	128,38	35,43	163,81	78
NS	18,08	4,92	23,00	78
RTO	0,79	0,83	1,62	49

NDF: número de días a floración, AP: altura de planta, NV: número de vainas/planta, NS: número de semillas/vaina, RTO: rendimiento de grano. VG: varianza genética, VE: varianza ambiental, VF: varianza fenotípica y h^2 heredabilidad.

El coeficiente de correlación simple de Pearson fue significativo ($p < 0,05$) entre RTO y las variables NV ($r = 0,52$) y NS ($r = 0,42$), lo que se observa en el análisis de sendero como r total (Tabla 5).

El coeficiente de sendero entre RTO y NV muestra que la correlación directa entre estas variables fue de 0,90, en tanto que las correlaciones indirectas vía las variables NDF y AP fueron negativas y de una magnitud de -0,25 y -0,13 respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Valencia Ramírez y Ligarreto Moreno (2013) quienes, en variedades de soja, encontraron correlaciones positivas entre dichas variables, principalmente debidas a efectos directos.

La correlación entre RTO y NS fue debida, principalmente, a efectos indirectos positivos vía las variables NDF y NV, con valores de 0,24 y 0,13 respectivamente (Tabla 5). Estos resultados indican que la estrategia más apropiada de selección indirecta para RTO es vía NV.

Tabla 5. Coeficientes de Sendero (*Path Analysis*) en la población F₂.

Efecto	Vía	Coeficientes	p-valor
NDF	Directa	-0,52	
NDF	AP	-0,05	
NDF	NV	0,44	
NDF	NS	-0,03	
r total		-0,16	0,4257
AP	Directa	-0,20	
AP	NDF	-0,13	
AP	NV	0,58	
AP	NS	3,1E-03	
r total		0,26	0,1881
NV	Directa	0,90	
NV	NDF	-0,25	
NV	AP	-0,13	
NV	NS	0,01	
r total		0,52	0,0042
NS	Directa	0,06	
NS	NDF	0,24	
NS	AP	-0,01	
NS	NV	0,13	
r total		0,42	0,0271

RTO: rendimiento de grano, NDF: número de días a floración, AP: altura de planta, NV: número de vainas/planta, NS: número de semillas/vaina.

Basándonos en los resultados obtenidos se realizó selección de planta individual y se sembró su descendencia.

En la población F₃ el análisis de la varianza detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las familias para todos los caracteres evaluados (Tabla 6).

Tabla 6. Cuadrados medios, significancia y valores de F para las familias F₃

FV	NDF	F	NDM	F	AP	F	NV	F	RTO	F
Entre familias	120.30	8.8*	203.19	7.6*	747.04	1.67*	4641.06	5.71*	765.56	6.74*
Dentro de familias	13.67		26.75		447.61		812.75		113.62	

*significación $p < 0,05$. NDF: número de días a floración, NDM: número de días a madurez, AP: altura de planta, NV: número de vainas/planta, RTO: rendimiento de grano.

Los valores de varianza genética fueron superiores a los de varianza ambiental, por lo que se obtuvieron coeficientes de h^2 elevados (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros genéticos de las familias F₃.

Variables	VG	VE	VF	h^2
NDF	53.3	13.7	66.9	0.79
NDM	88.2	26.7	114.9	0.76
AP	149.7	447.6	597.3	0.25
NV	1914.1	812.7	2726.9	0.70
RTO	325.9	113.6	439.6	0.74

NDF: número de días a floración, NDM: número de días a madurez, AP: altura de planta, NV: número de vainas/planta, RTO: rendimiento de grano. VG: varianza genética, VE: varianza ambiental, VF: varianza fenotípica y h^2 heredabilidad.

Monteverde (1984) evaluando 3 poblaciones F₃ de soja, obtuvo valores de heredabilidad en sentido amplio más altos para NDM (82,7; 78,25; 62,35), pero más bajos para RTO (53,75; 33,90; 11,38) que los estimados en el presente trabajo. Los resultados de Costa *et al.* (2002) en poblaciones segregantes de soja son coincidentes en relación al coeficiente de heredabilidad para AP (0,25), pero difieren para NV, dado que estos autores informaron valores menores (0,31).

De 95 de las 128 líneas F₅ seleccionadas se extrajo el ADN para realizar la selección asistida. Utilizando el marcador para *Lx2* se seleccionaron 40 familias que resultaron nulas para las lipoxigenasas 1 y 2 (Figura 1).

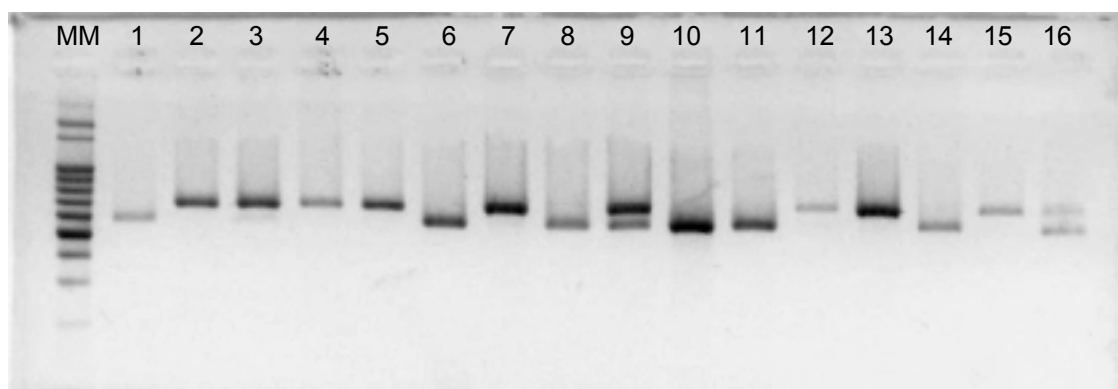


Figura 1. Marcador para *Lx2*. Calles 1-13: individuos analizados, 14: progenitor mutante, 15: progenitor normal, 16: heterocigota.

Por medio del marcador para el alelo *lx3* se pudieron seleccionar 56 familias que al menos llevan una copia de este alelo (Figura 2). Debido al avance de las generaciones analizadas, es posible afirmar que éstas serían nulas para la lipoxigenasa 3 debido al grado de homocigosis alcanzado.

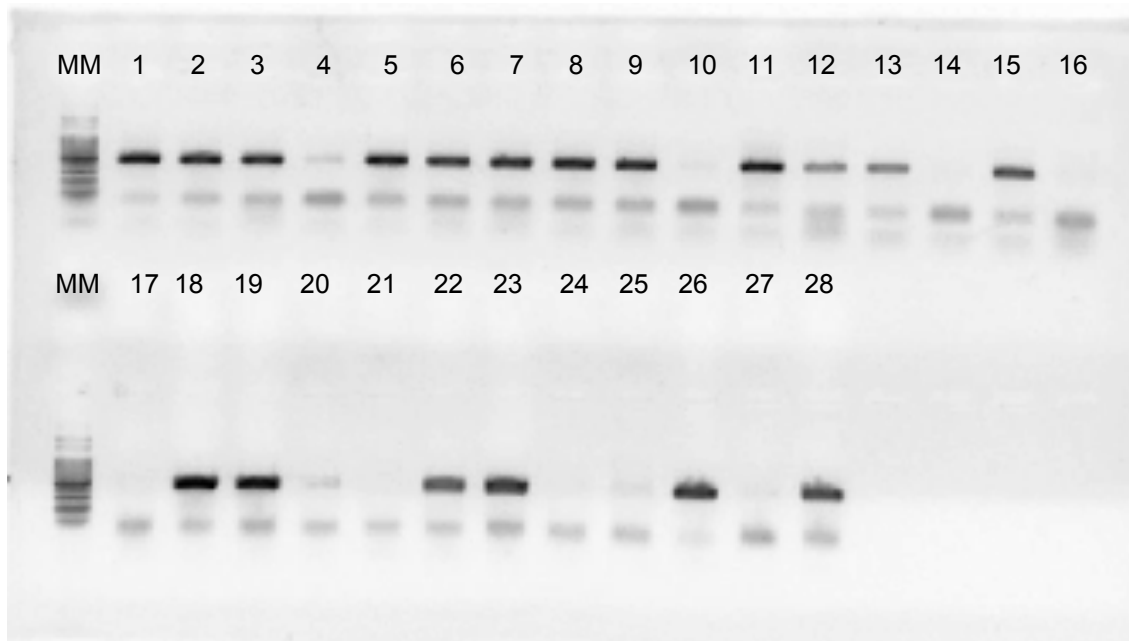


Figura 2. Marcador para *lx3*. Calles 1-26: individuos analizados, 27: progenitor normal, 28: progenitor mutante.

La selección realizada por el marcador molecular para *Kti* permitió identificar 50 familias nulas para Kunitz (Figura 3).

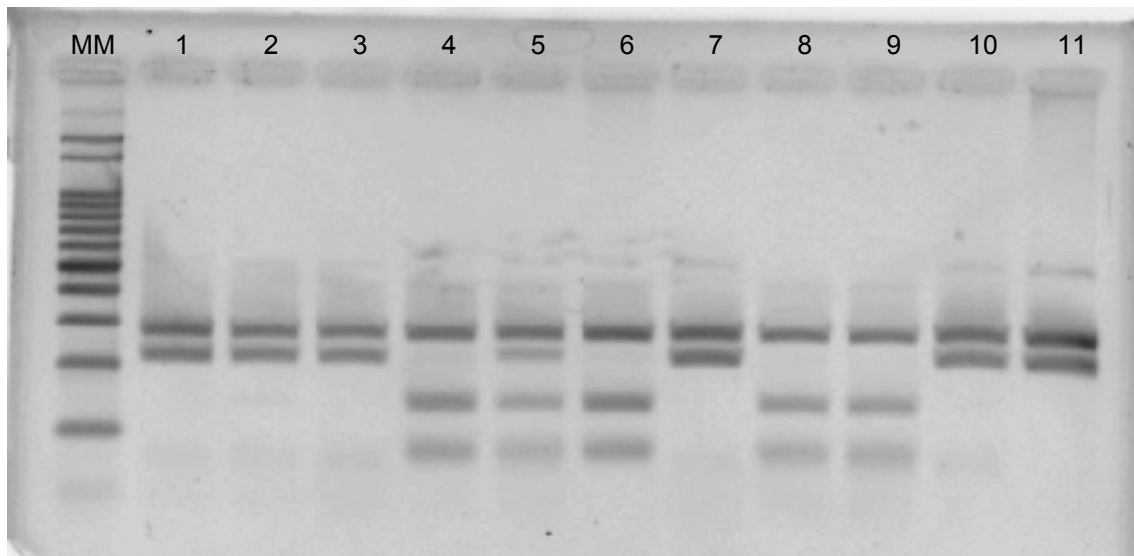


Figura 3. Marcador para *Kti*. Calles 1-8: individuos analizados, 9: progenitor normal, 10: progenitor mutante, 11: Línea experimental.

Nueve familias resultaron nulas para ambas características, por lo que fueron seleccionadas para continuar con el proceso de mejoramiento. Se identificaron 14 familias que contienen doble copia de los tres alelos mutantes para lipoxigenasas y 51 familias que llevan doble copia del alelo mutante para Kunitz pero que son normales para las tres lipoxigenasas. Otras familias portan combinaciones de las características buscadas, 19 familias nulas para Kunitz y para lipoxigenasa 3, y 6 familias nulas para Kunitz y para lipoxigenasas 1 y 2. Moraes *et al.* (2002) por medio de retrocruzamientos asistidos por marcadores moleculares obtuvieron líneas de soja con ausencia de los inhibidores de tripsina Kunitz, a través de la selección de individuos que presentaban bandas (alelos recesivos). El fenotipo fue confirmado por electroforesis, dado que los patrones permitieron distinguir los individuos homocigotas recesivos de los heterocigotas.

Si bien se encontraron familias con doble copia de los alelos mutantes para las características deseadas, éstas deberían ser sometidas a nuevos programas de mejoramiento para introgresar otros genes importantes. Esto se debe a que los individuos de las familias seleccionadas aún mantienen actividad inhibitoria de tripsina, debido a la presencia de otros FAN como por ejemplo el Bowman Birk, y aún contendrían sabor rancio y amargo en sus aceites como consecuencia de la oxidación, aunque más lenta, de

los ácidos grasos poliinsaturados.

En las líneas F₆, el análisis de la varianza arrojó diferencias muy significativas ($p < 0,001$) para las variables RTO y PS. Según el test de Tukey, el testigo SPS3900 superó en RTO al resto de los materiales evaluados y las líneas 1513.2; 1535.1; 1579.2 y el testigo FN545 fueron estadísticamente iguales, ocupando el segundo puesto. En cuanto a la variable PS la línea 1535,1 fue estadísticamente superior y en segundo lugar, estadísticamente iguales, se ubicaron las líneas 1527.1; 1560.2; 1524.2; 1528.1 y el testigo SPS3900.

El análisis de componentes principales explicó 78,5% del total de la variación entre las dos primeras CP. Según la CP1, las líneas 1554.2 y 1579.2 se asocian a las variables NDF, NDM y AP y se diferencian de la línea 1542.2. Las líneas 1528.1; 1534.2; 1560.2 y 1535.1 están asociadas a las variables RTO y PS. La CP2 separa al testigo FN545 (GM V medio) y la línea 1512,1 de los testigos SPS3900 (GM III largo) y P94B73 (GM IV corto), y las líneas 1534.2; 1528,1. En cuanto a la relación entre las variables se observa correlación positiva entre todas, excepto entre RTO y NDF, que no presentan correlación (Figura 4). En 2006, Gill-Langarica *et al.*, caracterizando 108 genotipos de soja, también detectaron correlación positiva entre RTO y PS. En contraste, Bologna *et al.* (2009a), trabajando con líneas avanzadas de soja seleccionadas por contenido de aceite, no detectaron correlación entre dichas variables.

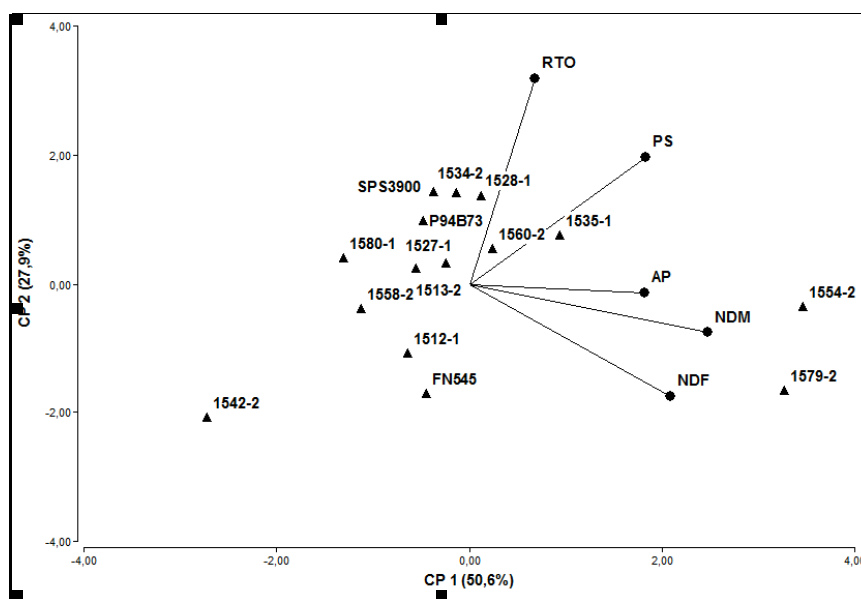


Figura 4. Biplot para las líneas F₆. Los triángulos representan las líneas F₆ y los círculos las variables: NDF: número de días a floración, NDM: número de días a madurez, AP: altura de planta, RTO: rendimiento de grano, PS: peso de semillas.

Los resultados del agrupamiento jerárquico se visualizaron en un dendrograma, en el que se determinaron tres conglomerados. En el grupo 1 se encuentran dos líneas que no se asocian a ningún testigo, en el grupo 2 se ubica el testigo del GMV medio (FN545) con una línea y en el grupo 3, los testigos de los GM IV corto y III largo (P94B73 y SPS3900) con las nueve líneas restantes (Figura 5). Bologna *et al.* (2012) evaluando líneas F_6 de soja seleccionadas por contenido de proteína, también lograron determinar el grupo de madurez de dicho germoplasma a través de un análisis de conglomerados que permitió asociar el ciclo de las líneas con el de los testigos evaluados.

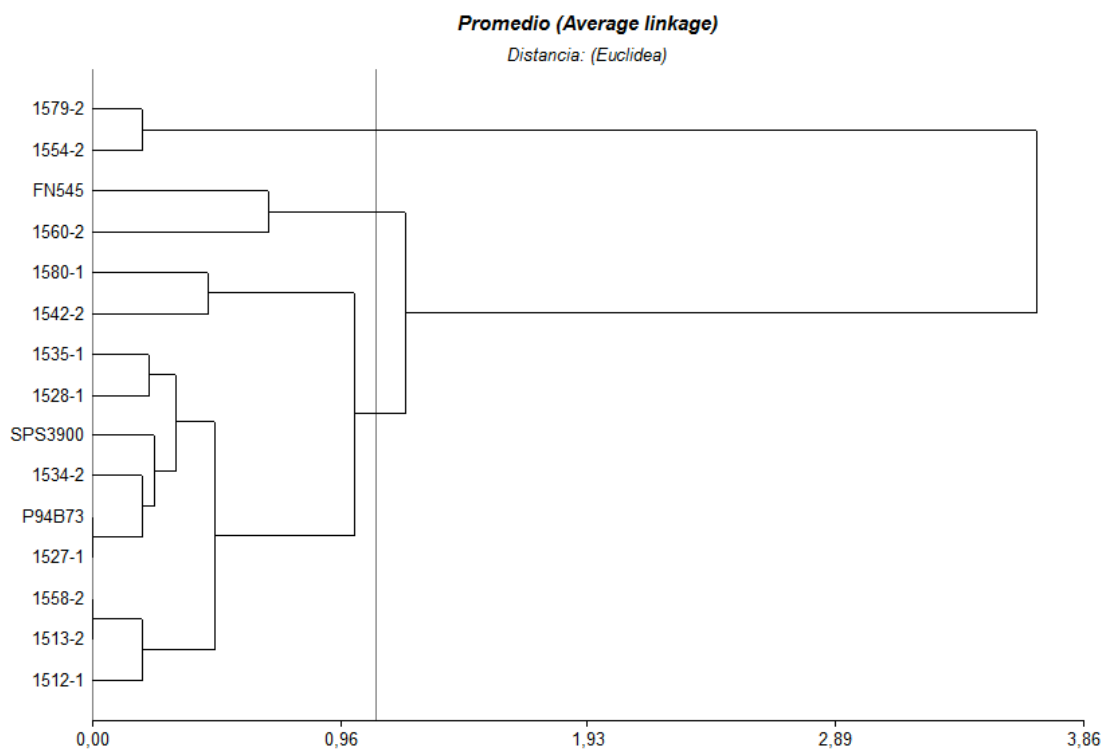


Figura 5. Dendrograma resultante del análisis de conglomerado aplicado sobre las líneas F_6 . Los datos incluyen las variables de ciclo: NDF: número de días a floración, NDM: número de días a madurez.

Se destaca que las dos líneas que se separaron a nivel de la CP1 asociándose con las variables NDF y NDM coinciden con las que se agruparon sin testigos en el análisis de conglomerado; esto último sugiere que el ciclo de dichas líneas no se corresponde con el ciclo de ninguno de los testigos evaluados, ya que éstas presentan ciclos más largos.

Por otro lado, del mismo modo que en el ACP se visualizaba una fuerte asociación entre los testigos SPS3900 y P94B73 con las líneas 1534.2 y 1528.1, en la matriz de distancias Euclídeas, estos materiales presentaron los menores valores. Esto sugiere que dichas líneas no solo pertenecen a estos grupos de madurez sino que también se asemejan a los testigos en el resto de las variables.

CONCLUSIONES

Los parámetros genéticos utilizados fueron eficientes como herramientas para la selección de los genotipos superiores en las poblaciones segregantes.

Los coeficientes de heredabilidad en sentido amplio para los caracteres de productividad fueron en general superiores a 50 %, lo que indica una situación favorable para la selección por dichos caracteres.

La estrategia más apropiada de selección indirecta para RTO es vía NV.

La utilización de los marcadores moleculares diseñados facilitó la identificación rápida y eficiente de germoplasma con ausencia de lipoxigenasas y de factores antinutricionales Kunitz.

De las líneas que expresaron mayor RTO y PS, una presenta ciclo similar al del testigo del GMV medio y tres a los testigos de los GM III largo y IV corto.

La variabilidad generada para los caracteres de calidad permitió la obtención de germoplasma sin lipoxigenasas y factores antinutricionales Kunitz.

BIBLIOGRAFÍA

- Armour J.C., Perera R.L., Buchan W.C., Grant G. (1998) Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of Science Food and Agriculture* 78: 225-231.
- Axelrod B., Cheesbrough T.M., Laakso S. (1881) Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymol.* 71: 441-451.
- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2008) InfoGen versión 2008. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
- Bologna S.B., Rojas E., Martínez Alvarez D.L., Escudero S. (2009a) Variability in agronomic traits and quality of soybean oil. *BIOCELL* 33(1): A61.
- Bologna S.B., Rojas E., Soldini D.O., Martínez Alvarez D.L., Perlo V.S. (2009b) Variabilidad genética y correlación en poblaciones F₂ de soja con caracteres para consumo humano. *Lilloa* 45. Suplemento XXXVIII Congreso Argentino de Genética, San Miguel de Tucumán; p. 46.
- Bologna S.B., Rojas E., Soldini D.O., Martínez Alvarez D.L., Escudero S., Cattaneo N., Arnáez J., Lucero V. (2012) Maturity group determination in soybean germoplasm with nutritional quality. *BIOCELL* 36(3): A99-A160.
- Costa M.M., Di Mauro A.O., Bárbaro I.M., Goncalves E.C.P., Muniz F.R.S. (2002) Desenvolvimento de populacoes segregantes visando a selecao de genótipos resistentes as principais doenças da soja. II Congresso Brasileiro de Soja. *MERCOSOJA 2002*, Foz do Iguazú, Brasil; p. 183.
- Fehr W.R., Caviness C.E., Burmood D.T., Pennington J.S. (1971) Stage of development descriptions for soybeans. *Crop Science* 11: 929-931.
- Gill-Langarica H.R., Pecina-Quintero V., Maldonado-Moreno N., Hernández-Delgado S., Mayek-Pérez N. (2006) Caracterización morfoagronómica y genética de germoplasma mejorado de soya. *Agricultura técnica en México* 32(3): 281-294.
- Jofuku K.D., Schippe R.D., Goldberg R.B. (1989) A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. *The Plant Cell* 1: 427-435.
- Kempthorne O. (1973) *An Introduction to Genetic Statistic*. The Iowa State University Press - Ames, Iowa, USA.
- Liener I.E. (1995) Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. *Journal of Nutrition* 125: 744-750.
- Monteverde E. (1984) Correlaciones fenotípicas y genotípicas entre rendimiento, proteína, aceite y otras características en soja (*Glycine max*). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*, XIII (1-4): 183-214.
- Moraes R.M.A., Soares T.C.B., Colombo L.R., Salla M.F., Barros J.G., Soares Y.J.B., Piovesan N.D., Barros E.G., Moreira M.A. (2002) Melhoramento da qualidade da soja para eliminação genética de lectina e do inibidor de tripsina Kunitz por meio de retrocruzamentos. II Congresso Brasileiro de Soja. *MERCOSOJA 2002*, Foz do Iguazú, Brasil; p. 188.

- Morceli T.G.S., Morceli A.A. Jr., Di Mauro A.O., Uneda-Trevisoli S.H., Silveira G.D., Costa M.M., Muniz F.R.S., Sarti D.G.P. (2006) Estimativa da heredabilidade em genótipos segregantes de soja na região de Jaboticabal – SP. 3º Congreso de soja del Mercosur. Rosario, Santa Fé (Argentina). Conferencias plenarias; p. 235-237.
- Sarti D.G.P., Di Mauro A.O., Uneda-Trevisoli S.H., Costa M.M., Bárbaro I.M., Muniz F.R.S., Silveira G.D., Morceli A.A., Morceli T.G.S. (2006) Análise genética de geração F₇ de soja con fonte de resistencia ao nematoide de cisto- RAÇA 3. 3º Congreso de soja del Mercosur. Rosario, Santa Fé (Argentina); p. 264-267.
- Sequin L., Vanzetti L.S., Soldini D.O., Gilli J.R. (2008) Diseño de marcadores moleculares funcionales para características diferenciales de calidad en soja (*Glycine max* L. Merr.). XXXVIII Congreso Argentino de Genética. Tandil, Argentina; p. 152.
- Sequin L. (2009) Introgresión asistida por marcadores moleculares de los alelos nulos para lipoxigenasas en soja (*Glycine max*. L. Merr.). Tesis de Maestría en Genética Vegetal, Área Mejoramiento Genético, UNR-INTA.
- Siedow J.N. (1991) Plant lipoxygenase: Structure and Function. Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology 42:145-148.
- Soldini D.O. (2004) Desarrollo de germoplasma de soja para consumo humano. AgroInnova 116-120.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. (1985) Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España.
- Valencia Ramírez R.A. y Ligarreto Moreno G.A. (2013) Correlación fenotípica y análisis de sendero para el rendimiento de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Acta Agronómica, Suplemento 1, vol 61(4): 353-363.
- Vicentini R., Lassaga S., Scandolo B., Gianotti L., Velázquez S., Ditrich A. (2009) Nuevos cultivares de soja no transgénicas, con bajo contenido de inhibidores de tripsina, obtenidos en la EEA INTA Paraná. 3º Congreso de Soja del Mercosur. Rosario, Santa Fe (Argentina); p. 201-203.
- Wining S., Langridge P. (1991) Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. Theoretical and Applied Genetics 82:209-216.

GENOTYPIC ANALYSIS OF C677T AND A1298C POLYMORPHISMS IN THE METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE AND A66G POLYMORPHISM IN THE METHIONINE SINTASE REDUCTASE GENE IN DOWN SYNDROME

ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LOS POLIMORFISMOS C677T Y A1298C EN EL GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y EL POLIMORFISMO A66G EN EL GEN DE METIONINA SINTASA REDUCTASA EN SÍNDROME DE DOWN

Rengifo Ramos L.¹, Gaviria Arias D.¹

¹Centro de Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

cenbiotep@utp.edu.co

ABSTRACT

The C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and the A66G polymorphism in the methionine sintase reductase gene (MTRR) were analyzed -using PCR-RFLP- in 141 individuals with Down syndrome and 200 control individuals (108 men and 92 women) in a Colombian coffee growing region. Allelic and genotypic frequencies were very similar in both populations. The 677CT, 1298AA and 66AG genotypes were most common in the Down syndrome population whereas the 677CC and 66AA genotypes were most common in the controls. In comparing allelic and genotypic frequencies in both populations using Pearson's X^2 test and Odds Ratio, no statistically significant differences were found. The MTHFR T--A haplotype was the most frequent in both populations whereas the MTHFR T--C haplotype was the least frequent in both, the population with Down syndrome (0.0303) and the controls (0.0042). The MTHFR T--C haplotype was positively associated with Down syndrome (OR = 7.4; IC 95% = 4.78-107.45). Linkage disequilibrium ($D' = 0.8262$) was detected between the two polymorphisms in the MTHFR gene.

Key words: Down syndrome, genotypes, MTHFR, MTRR.

RESUMEN

Los polimorfismos C677T y A1298C en el gen de la 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa y el polimorfismo A66G en el gen de la metioninasintasa reductasa fueron analizados usando la técnica de PCR-RFLP en 141 individuos con síndrome de Down y en 200 individuos saludables (108 hombres y 92 mujeres) de una región cafetera colombiana. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron muy similares en ambas poblaciones. Los genotipos 677CT, 1298AA y 66AA fueron más comunes en los individuos con síndrome de Down mientras que los genotipos 677CC y 66AA fueron más comunes en los controles. Comparando las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población con síndrome de Down y la control usando la prueba de X^2 de Pearson y *Odds Ratio* no encontramos diferencias estadísticamente significativas. El haplotipo MTHFR T--A fue el más frecuente en ambas poblaciones y el haplotipo MTHFR T--C fue el menos frecuente en ambas poblaciones, en los individuos con síndrome de Down (0,0303) y en los controles (0,0042). El haplotipo MTHFR T--C estuvo asociado positivamente con síndrome de Down (OR = 7,4; IC 95% = 4,78-107,45) y se encontró desequilibrio de ligamiento ($D' = 0,8262$) entre los dos polimorfismos del gen MTHFR.

Palabras clave: Síndrome de Down, genotipos, MTHFR, MTRR.

Fecha de recepción: 07/10/2013
Fecha de aceptación de versión final: 07/05/2014

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Down (OMIM 190685) es una enfermedad genética compleja que ocurre con una prevalencia de 1/732 (Sherman et al., 2007), en la que 75% de los fetos con síndrome de Down se pierden en el primer trimestre y 50% en el segundo trimestre de la concepción (Spencer, 2001). El síndrome de Down es una alteración cromosómica caracterizada por la presencia completa o parcial de un cromosoma 21 extra, generado por una no disyunción durante la meiosis I y II la cual en la mayoría de los casos es de origen materno (Sherman et al., 2005; Allen et al., 2009). Diferentes estudios clínicos y experimentales muestran que la hipometilación del ADN genómico está asociada con inestabilidad cromosómica y segregación anormal. La hipometilación puede ser ocasionada por deficiencias de folato que en los seres humanos se debe a factores ambientales y genéticos. Entre los factores ambientales se encuentran la desnutrición, el síndrome de mala absorción intestinal, medicamentos anticonvulsivantes, ingesta insuficiente de alimentos ricos en ácido fólico, consumo elevado de café y alcohol, el cigarrillo, escasa actividad física y embarazo (Cortés et al., 2000; Lardoeft et al., 2005). Entre los factores genéticos están los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes de las enzimas que intervienen en el metabolismo de ácido fólico especialmente en la remetilación de homocisteína a metionina entre ellos los genes de la 5, 10- metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR; EC 1.5.1.20; 1p36.22), metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1; EC 1.5.1.5; 14q24), glutamato carboxipeptidasa (GCPI EC 3.4.17.21; 11p11.12), metionina sintasa reductasa (MTRR; EC 2.1.1.135; 5p15.31) y en el transportador del folato reducido 1 (RFC1; 21q22.3) (Shi et al., 2003).

La actividad enzimática de la MTHFR consiste en catalizar la transformación de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, el cual es donante de grupos metilos para la remetilación, dependiente de vitamina B₁₂, de homocisteína a metionina. La metionina es el precursor para la síntesis de S-adenosil metionina (SAM), el más importante donante de grupos metilos celulares para la metilación del ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos. La reducción en la actividad enzimática aumenta el requerimiento dietario de ácido fólico para mantener la remetilación normal de la homocisteína a metionina (Bailey et al., 1999). Bajos niveles de folato en sangre producen niveles elevados de homocisteína en sangre y una disminución en los niveles de metionina. La hiperhomocisteinemia crónica origina una disminución en la relación de S-adenosil metionina (SAM)

a S-adenosilhomocisteína (SAH), inhibiendo la metiltransferasa y, en consecuencia, generando la hipometilación del ADN (Pogribny, et al., 1995; Melnyk et al., 2000). La hipometilación del ADN está asociada tanto *in vivo* como *in vitro* con inestabilidad cromosómica y segregación anormal (Lengauer et al., 1997; Pogribny et al., 1997; Xu et al., 1999), rupturas cromosómicas, presencia incrementada de micronúcleos, recombinación cromosómica anormal y aneuploidías (Fenech, 2001).

Los cambios en la secuencia del ADN de mal sentido en el gen MTHFR, uno de transición C677T (A222V) en el exón 4 y el otro de transversión A1298C (E429A) en el exón 7 son los más comunes (Frosst et al., 1995; Weisberg et al., 1998). En la enzima metionina sintasa reductasa se ha identificado una variante común en el gen, la MTRR A66G (I22M) (Leclerc et al., 1998). Aunque el polimorfismo A66G no cambia la actividad catalítica de la enzima, la frecuencia del genotipo 66GG es más alta en individuos con defectos congénitos (Isotalo et al., 2000).

La asociación entre la deficiencia de folato e hipometilación del ADN sugiere que deficiencias genéticas y nutricionales que afectan negativamente el metabolismo del folato pueden estar relacionadas con el incremento del riesgo a la no disyunción y síndrome de Down y podría considerarse como un factor de riesgo independiente de la edad materna para este síndrome (Hobbs et al., 2000). Se han hecho diferentes estudios para encontrar la asociación de las variantes 677T y 1298C de la MTHFR y 66G de la MTRR en madres de niños con síndrome de Down, con el fin de encontrar un probable valor predictivo de riesgo materno para engendrar hijos con síndrome de Down. Debido a que estos alelos pueden aumentar el riesgo de engendrar individuos con síndrome de Down, los individuos con esta entidad pueden presentar estas variantes alélicas con mayor frecuencia que la población sana (James et al., 1999; Hobbs et al., 2000; Stupia et al., 2002; Scala et al., 2006; Pozzi et al., 2009; Coppédé et al., 2009; Cyril et al., 2009; Amorin et al., 2013). Para poner a prueba esta hipótesis se analizaron los polimorfismos C677T y A1298C en el gene de la enzima MTHFR y el polimorfismo A66G de la MTRR en una población con síndrome de Down originaria de Risaralda y Quindío, región cafetera en Colombia, Sur América y se compararon estos resultados con una población control. Adicionalmente se compararon nuestros resultados con los hallazgos de otros estudios poblacionales en individuos sanos y con síndrome de Down.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población analizada: 141 individuos con síndrome de Down (75 hombres y 66 mujeres), sin pertenencia étnica (blancos x mestizos) DANE (2007) con diagnóstico clínico y confirmación por cariotipo con la técnica de bandas G. Los estudios cromosómicos mostraron 131 (93%) individuos con trisomía 21 por un cromosoma 21 extra, 5 (3,5%) individuos con translocación 13/21, 3 (2%) individuos con translocación 14/21 y 2 individuos (1,5%) en mosaico. Sus edades oscilaron entre los 2 días y 49 años (edad promedio de 11 años). Los individuos con síndrome de Down fueron colectados en cuatro Centros de educación especial de Risaralda y Quindío, Región Cafetera de Colombia. Este estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. Los padres y representantes legales firmaron el consentimiento informado para la participación de los individuos con síndrome de Down. Para la población control se escogieron 200 individuos sanos no relacionados (108 hombres y 92 mujeres) con edades entre 6 y 50 años del mismo grupo étnico y de la misma región geográfica que los individuos con síndrome de Down y que pertenecen al banco de muestras del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira (CENBIOTEP).

Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs): Todas las muestras de casos y controles fueron genotipificadas para los genes de las enzimas MTHFR y MTRR usando PCR-RFLP. Los polimorfismos C677T y A1298C fueron determinados usando la metodología descrita por Wiemels et al. (2001) con algunas modificaciones y los polimorfismos en MTRR A66G fueron evaluados según la metodología descrita por Wilson et al., (1999) con algunas modificaciones. El ADN genómico fue extraído de leucocitos de sangre periférica usando el estuche comercial de la casa GENTRA/Puregene kit (Minneapolis, USA). Dos fragmentos de 158 y 145 pares de bases fueron amplificados por PCR para las variantes C677T y A1298C del gene MTHFR y un fragmento de 66 pares de bases para la variante A66G del gene de la MTRR. Se usaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores: 5'-CCTTGAACAGGTGGAGGCC-3', 5'-CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT-3' para C677T y 5'-GCAAGTCCCCAAGGAGG-3', 5'-GGTCCCCACTTCCAGCATC-3' para A1298C. 5'-GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA-3' y

5'-CATGGAAGAATATCAAGAATATTAGA-3' para A66G. La mezcla de reacción contenía 1,25 U de Taq polimerasa (Promega). 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 200mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 5mM de cada uno de los iniciadores y 100 ng de ADN genómico, el volumen final de la reacción fue 25 ml. Después de la desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 min, siguieron 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 min, 60°C por 1 min, y 72°C por 1 min) y una extensión final a 72°C por 10 min. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con las enzimas de HinfI por 4 h a 37°C para C677T y la enzima de restricción MboII por 4 h a 37°C para A1298C de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). El programa de amplificación para A66G del gene de la MTRR fue de 95°C durante 2 min para la desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos de amplificación (95°C por 30 s, 55°C por 15 s y 72°C por 45 s) y una extensión final a 72°C por 6 min. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción NdeI (Promega), por 4 h a 37°C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio; los resultados fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (Fotodyne). El registro permanente de los datos se hizo utilizando una cámara digital Nikon D-100.

Análisis estadístico: El análisis estadístico de los resultados fue llevado a cabo utilizando el paquete estadístico Statgraphics ver 5.0. El equilibrio de Hardy Weinberg para cada uno de los SNPs fue analizado mediante una prueba de Chi cuadrado (X²) usando Excel. Las diferencias entre casos y controles fueron evaluadas mediante una prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se calcularon los *Odds Ratio* (OR) y los correspondientes intervalos de confianza del 95% con el fin de determinar la asociación de las frecuencias en los polimorfismos analizados y la presencia del síndrome de Down. Los análisis haplotípicos y de desequilibrio de ligamiento para los SNP evaluados fueron llevados a cabo en SNPstats (Solé et al., 2006).

RESULTADOS

Se analizaron por separado las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs C677T y A1298C del gene MTHFR y el SNP A66G del gene de la MTRR para las poblaciones de

casos y controles (Tabla 1). Los SNPs evaluados en el gen MTHFR se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) tanto en la población de casos (C677T: $X^2 = 0,27$ $gl=1$; $p>0,05$. A1298C: $X^2 = 0,089$ $gl=1$; $p>0,05$) como de controles (C677T: $X^2 = 0,99$ $gl=1$; $p>0,05$. A1298C: $X^2 = 0,057$ $gl=1$; $p>0,05$). El SNP evaluado en el gen MTRR se encontró en equilibrio H-W tanto en casos (A66G: $X^2 = 7,67E-07$ $gl=1$; $p>0,05$) como en controles (A66G: $X^2 = 2,17E-05$ $gl=1$; $p>0,05$).

En el gen MTHFR los genotipos más frecuentes en las poblaciones de casos y controles fueron 56% y 50% respectivamente para 677CT, y 69% y 66% para 1298AA, y el menos frecuente fue 677TT en ambas poblaciones (21% vs 20%). El genotipo 1298CC se encontró solamente en un individuo de la población control. Al realizar la separación por género, los genotipos 677CT y 1298AA se encontraron más frecuentemente en mujeres (62% y 71%, respectivamente) con síndrome de Down que en las mujeres de la población control (50% y 68%) y el genotipo

677TT fue más frecuente en hombres con síndrome de Down (24%) que en los controles (19%) (Tabla 1). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). De acuerdo con estos resultados, la combinación genotípica más frecuente en ambas poblaciones fue 677CT/1298AA y la menos frecuente 677TT/1298CC.

El análisis de los polimorfismos estudiados en el gen MTHFR mostró que las frecuencias alélicas de 677T (49%) y 677C (51%) fueron mayores y menores, respectivamente, en la población con síndrome de Down en relación a la población control (45% y 54%). Para el resto de alelos las frecuencias fueron muy similares en ambas poblaciones. Al realizar la separación por género, la frecuencia alélica de 677T fue mayor en los hombres con síndrome de Down (50%) que en los hombres de la población control (44%), y muy similares en las mujeres de ambas poblaciones. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). En el resto de alelos las frecuencias fueron muy similares en ambas poblaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias genotípicas (a) y alélicas (b) de los polimorfismos MTHFR C667T y MTHFR A1298C en el gen de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa y el polimorfismo MTRR A66G en el gen de la enzima metionina sintasa reductasa en individuos con síndrome Down de la región cafetera colombiana y una población control.

Frecuencias genotípicas (%)										
n (%)	MTHFR C667T			MTHFR A1298C			MTRR A66G			
	CC *	CT	TT	AA	AC	CC	AA	AG	GG	
Casos	141	32 (23,4)	80 (56,03)	29 (20,57)	97 (68,79)	44 (31,21)	0	13 (9,22)	101 (70,92)	27 (19,85)
Controles	200	59 (29,5)	100 (50,0)	41 (20,5)	66 (33,0)	133 (66,5)	1 (0,5)	36 (18,0)	129 (64,5)	35 (17,5)
Mujeres	66	14 (21,21)	41 (62,12)	11 (16,67)	47 (71,21)	19 (28,79)	0	6 (9,10)	47 (71,21)	13 (19,69)
Mujeres Controles	92	26 (28,26)	46 (50,0)	20 (21,74)	63 (68,48)	29 (31,52)	0	16 (17,39)	59 (64,13)	17 (18,48)
Hombres	75	18 (24,0)	39 (52,0)	18 (24,0)	50 (66,67)	25 (33,33)	0	7 (9,33)	54 (72,0)	14 (18,67)
Hombres Controles	108	33 (30,56)	54 (50,0)	21 (19,44)	70 (64,81)	37 (34,26)	1 (0,93)	20 (15,52)	70 (64,81)	18 (16,67)

* par nucleotídico

Frecuencia Alélica (%)							
n	MTHFR C667T		MTHFR A1298C		MTRR A66G		
	Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C	Alelo A	Alelo G	
Casos	282	144 (51,06)	138 (48,93)	238 (84,4)	44 (15,6)	127 (44,68)	155 (55,32)
Controles	400	218 (54,5)	182 (45,5)	332 (83,0)	68 (17,0)	201 (50,25)	299 (49,75)
Mujeres	132	69 (52,28)	63 (47,72)	113 (85,6)	19 (14,4)	59 (44,69)	73 (55,3)
Mujeres Controles	184	98 (53,27)	86 (46,73)	155 (84,23)	29 (15,77)	91 (49,45)	93 (50,54)
Hombres	150	75 (50,0)	75 (50,0)	125 (83,33)	25 (16,67)	68 (45,33)	82 (54,67)
Hombres Controles	216	120 (55,56)	96 (44,44)	177 (81,94)	39 (18,06)	110 (50,92)	106 (49,08)

El haplotipo más frecuente en ambas poblaciones fue MTHFR T---A y el menos frecuente MTHFR T---C tanto en los individuos con síndrome de Down (0,0303) como en los controles (0,0042). El haplotipo MTHFR T---C se encontró asociado positivamente con síndrome de Down (OR = 7,4; IC 95% = 4,78-107,45) (Tabla 3). Se encontró desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos analizados del gen MTHFR con un valor $D' = 0,8262$.

En el gen MTRR, el genotipo 66AG fue el más frecuente tanto en los individuos con síndrome de Down (71%) como en los controles (64%), mientras que el genotipo 66AA fue el menos frecuente en ambas poblaciones (Tabla 1). Al realizar la separación por género, el genotipo 66AA se observó con menos frecuencia (9%) en ambos

sexos de la población con síndrome de Down, mientras que en la población control esta frecuencia fue 15% en hombres y 17% en mujeres. La frecuencia alélica de 66G fue mayor en individuos con síndrome de Down (55%) que en la población control (50%); al separar por género, la frecuencia de 66A fue menor (45%) en ambos sexos de la población con síndrome de Down que en población control, en la que esta forma alélica se presentó con una frecuencia de 50% (Tabla 1). Al compararse estas dos poblaciones no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este polimorfismo (Tabla 2). Estos resultados indican que la combinación genotípica más frecuente para estos tres polimorfismos es 677CT/1298AA/66AG y la menos frecuente es 677TT/1298AC/66AA

Tabla 2. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en los genes MTHFR y MTRR entre las poblaciones de casos y controles utilizando una prueba de χ^2 de Pearson (valor p).

	Frecuencias genotípicas						Frecuencias alélicas					
	n	MTHFR C667T		MTHFR A1298C		MTRR A66G	n	MTHFR C667T	MTHFR A1298C	MTRR A66G		
		CC*	CT	TT	AA	AC		CC	AA	AG	GG	CT
Casos	141	0,342		0,653		0,075	282	0,376	0,628	0,188		
Controles	200						400					
Mujeres casos	66	0,319		NA		0,33	132	0,862	0,738	0,403		
Mujeres controles	92						184					
Hombres casos	75	0,563		0,695		0,227	150	0,295	0,731	0,292		
Hombres controles	108						216					

* par nucleotídico

DISCUSIÓN

Se han realizado varios estudios poblacionales de los polimorfismos analizados en el presente trabajo, en individuos saludables de diferentes grupos étnicos. En dichos estudios se evaluó la frecuencia de cada uno de los alelos y genotipos (Arruda et al., 1998; Monsalve et al., 2003; da Silva et al., 2005; Guéant-Rodríguez et al., 2006; Aléssio et al., 2007; Ulvik et al., 2007; Lupo et al., 2010; Wu et al., 2013), pero son muy escasos los estudios en individuos con síndrome de Down (Hobbs et al., 2002; Yanamandra et al., 2003; Fillon-Emery et al., 2004; Guéant et al., 2005; Licastro et al., 2006; Biselli et al., 2008).

En Colombia se conocen estudios de estos polimorfismos en poblaciones sanas (Bermúdez et al., 2006; González-Galofre et al., 2010), pero ninguno en individuos con síndrome de Down.

La frecuencia del alelo 677T es relativamente alta alrededor del mundo y muestra variación regional y étnica. En este estudio la frecuencia del alelo 677T en la población con síndrome de Down (48,58%) fue mayor a la encontrada en la población control (45,5%) y la frecuencia genotípica de 677TT en ambas poblaciones fue alrededor de 20,5%. Estas frecuencias alélicas y genotípicas son muy

similares a las encontradas en poblaciones sanas italianas e hispanas que viven en Estados Unidos de América (Li et al. 2005, Botto and Yang, 2000) y a otras poblaciones colombianas en las que la frecuencia del alelo 677T oscila entre 34.7% y 51.1% (Gonzalez-Galofre et al., 2010). Al analizar los estudios en otras poblaciones con síndrome de Down encontramos que existe transmisión preferencial del alelo T de origen materno a individuos con síndrome de Down (Hobbs et al., 2002). Licastro et al., (2006) observó una mayor frecuencia del genotipo 677TT en individuos con síndrome Down en contraste con nuestros resultados. Sin embargo, en otras poblaciones con síndrome de Down no se observó relación ni en estado homocigótico ni heterocigótico del alelo 677T con casos con síndrome de Down (Fillon-Emery et al., 2004; Yanamandra et al., 2003; Biselli et al., 2008) al igual que en el presente trabajo (Tabla 4). Al realizar la separación por género, la frecuencia del alelo 677T fue similar en ambos; sin embargo el genotipo 677TT fue más frecuente - aunque no significativamente- en los varones con síndrome de Down. Es probable que el género influya sobre la presencia de este genotipo en individuos con síndrome de Down. Es necesario contar con más estudios poblacionales para identificar esta correlación.

En el polimorfismo A1298C de la MTHFR, la frecuencia alélica de 1298C es muy variable y difiere entre poblaciones asiáticas (18%) y europeas (30%). La frecuencia del genotipo homocigótico 1298CC oscila entre 3 y 11% en poblaciones caucásicas, entre 7% y 21% en poblaciones asiáticas, (Wu et al., 2013) y entre 1,6% y 6% en poblaciones hispanas. En nuestro estudio, solo un individuo de la población sana presentó el genotipo 1298CC, lo que indica una frecuencia muy baja de este alelo en estado homocigótico, pues se encuentra mayormente representado en estado heterocigótico. Su frecuencia en nuestras poblaciones es cercana a la encontrada en poblaciones hispanas. Por el contrario, el alelo 1298A se observó en una proporción muy elevada en ambas poblaciones en comparación con el alelo 1298C. En poblaciones con síndrome de Down de Brasil, el alelo 1298C aparece con una frecuencia de 21% (Biselli et al., 2008), y en Francia con una frecuencia de 30% (Fillon-Emery et al., 2004). Estas frecuencias son mayores a las encontradas en la población colombiana con síndrome de Down (15,6%). El genotipo 1298AC es más frecuente -aunque no significativamente- en varones que en mujeres con síndrome de Down. Es importante contar con más datos de otras poblaciones con síndrome

de Down para concluir si hay correlación entre género y la combinación 677TT/1298AC con síndrome de Down.

En el polimorfismo A66G se observaron distribuciones de los dos alelos 66A y 66G muy similares entre los individuos con síndrome de Down y la población control; el genotipo 66GG muestra una frecuencia muy similar a la frecuencia del genotipo 66AA. El alelo 66G está mayormente representado en el estado heterocigótico 66AG. Al realizar la separación por género, las frecuencias alélicas y genotípicas fueron muy similares entre varones y mujeres con síndrome de Down. Diferentes estudios en poblaciones sanas en los que se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo muestran datos muy diversos. También hay variación geográfica y étnica y se reporta desequilibrio H-W (Ouyang et al., 2013; Ananth et al., 2007; O'Leary et al., 2002; Rady et al., 2002). Nuestros resultados se asemejan a los encontrados por Ananth et al., (2007) quienes analizaron una población norteamericana de varios orígenes étnicos. Solo se conoce un estudio de este polimorfismo en población con síndrome de Down, en la que se observó una frecuencia de 56,1% del alelo 66G (Fillon-Emery et al., 2004) que es similar a la observada en el presente estudio.

Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de estos tres polimorfismos entre las poblaciones de individuos con síndrome de Down y la población control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; dichas frecuencias son similares en individuos con síndrome de Down y controles, tanto en la población general como cuando se realiza la separación por género.

En diferentes estudios poblacionales de individuos sanos se ha demostrado que el haplotipo MTHFR—C es raro, con una frecuencia que va desde 0,005 (Ogino y Wilson, 2003) hasta 0,026 en México (Shi et al., 2003) lo que indica desequilibrio de ligamiento incompleto entre los dos polimorfismos del gen MTHFR. Biselli et al. (2008) no encontraron el haplotipo MTHFR—C en individuos con síndrome de Down y se desconocen más datos en otras poblaciones con síndrome de Down. En este estudio se estimó una frecuencia de 0,0303 para este haplotipo en individuos con síndrome de Down, significativamente más alta que en individuos sanos. Independientemente, las variantes 677T y 1298C no mostraron relación con síndrome de Down; sin embargo, al unir las dos variantes en el haplotipo MTHFR—C encontramos diferencias significativas con la población control.

Tabla 3. Estimación de la frecuencia haplotípica para Polimorfismos del gen MTHFR (n=341).

Polimorfismos		Total	Casos	Controles	Frecuencia acumulativa
MTHFR 677 T/C	MTHFR 1298 A/C				
T	A	0,4558	0,4591	0,4508	0,4558
C	A	0,38	0,3849	0,3792	0,8358
C	C	0,1508	0,1258	0,1658	0,9866
T	C	0,0134	0,0303	0,0042	1

Tabla 4. Frecuencias alélicas de los polimorfismos C677T, A1298C en el gen de la enzima MTHFR y el polimorfismo A66G del gen de la enzima MTRR en diferentes estudios poblacionales con síndrome Down.

Estudios	n	Frecuencia Alélica (%)					
		MTHFR C677T		MTHFR A1298C		MTRR A66G	
		Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C	Alelo A	Alelo G
Rengifo y Gaviria (2013)	282	51	49	84,4	15,6	44,7	55,3
Biselli et al. (2008)	112	63	37	79	21	—	—
Licastro et al. (2006)	26	42,3	57,7	—	—	—	—
Guéant et al. (2005)	262	51	49	42	58	—	—
Yanamandra et al. (2003)	44	63,6	36,4	—	—	—	—
Fillon Emery et al. (2004)	312	63,1	36,9	70	30	43,9	56,1

CONCLUSIONES

Se analizaron 682 alelos para los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima MTHFR y el polimorfismo A66G en el gen de la enzima MTRR en 141 individuos con síndrome de Down y 200 individuos sanos como población control. Las frecuencias alélicas de 677C y 677T para el polimorfismo C677T, 1298A 1298C para el polimorfismo A1298C de la enzima MTHFR, y las frecuencias alélicas de 66A y 66G en el gen de la MTRR fueron muy similares en ambas poblaciones. Los genotipos más frecuentes para el gen de la enzima MTHFR en los individuos con síndrome de Down fueron 677CT y 1298AA, y para el gen de la enzima MTRR fue 66AG. Los genotipos 677CC and 66AA fueron más comunes en los controles que en la población con síndrome de Down. No encontramos diferencias estadísticamente significativas para estos polimorfismos al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población con síndrome de Down y los controles. Sin embargo encontramos asociación del haplotipo MTHFR T--C con síndrome de Down. Nuestros resultados difieren de otros estudios realizados en poblaciones con síndrome

de Down y son similares a los encontrados en poblaciones sanas colombianas y de hispanos que viven en los Estados Unidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aléssio A.C.M., Höehr N.F., Siqueira L.H., Bydlowski S.P., Annichino-Bizzacchi J.M. (2007) Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B₁₂ concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphisms in healthy children. *Thromb. Res.* 119(5): 571-577.
- Allen E.G., Freeman S.B., Druschel C., Hobbs C.A., O'Leary L.A., Romitti P.A., Royle M.H., Torfs C.P., Sherman S.L. (2009) Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum. Genet.* 125: 41-52.

- Amorin MR., Costa-Lima MA. (2013) MTRR 66A>G Polymorphism as Maternal Risk Factor for Down syndrome: A Meta-Analysis. *Genet. Test. Mol. Bioma.* 17 (1): 69-73.
- Ananth C.V., Elsasser D., Kinzler W.L., Peltier M.R., Getahun D., Leclerc D., Rozen R.R. (2007) Polymorphisms in Methionine Synthase Reductase and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Genes: Risk of Placental Abruption. *Mol. Genet. Metab.* 91(1): 104-110.
- Arruda V.R., Siqueira L.H., Gonçalves M.S., von Zuben P.M., Soares M.C., Menezes R., Annichino-Bizzacchi J.M., Costa FF (1998) Prevalence of mutation C677 T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am. J. Med. Genet.* 78(4):332-337.
- Bailey L.B., Gregory J. (1999). Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes; metabolic significance, risks, and impact on folate requirement. *J. Nutr.* 129:919-922.
- Bermúdez M., Briceño I., Gil F., Bernal J. (2006) Homocisteína y polimorfismos de cistationina â sintasa y metilentetrahydrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colombia Médica.* 37: 46-52.
- Biselli J.M., Goloni-Bertollo E.M., Haddad R., Eberlin M.N., Pavarino-Bertelli E.C. (2008) The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41(1): 34-40.
- Botto L.D., Yang Q. (2000). 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase genes variants and congenital anomalies a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151: 862-877
- Coppedè F., Migheli F., Bargagna S., Siciliano G., Antonucci I., Stuppia L., Palka G., Migliore L. (2009) Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci. Lett.* 499 (1): 15-19.
- Cortés F., Hirsch S., de la Maza M.P. (2000) Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Rev. Med. Chile.* 128(2): 21-27.
- Cyril C., Rai P., Chandra N., Gopinath P.M., Satyamoorthy K. (2009) MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control study from South India. *Indian. J. Hum. Genet.* 15(2):60-4. doi: 10.4103/0971-6866.55217.
- da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V, Alvarez Perez AB. (2005) Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am. J. Med. Genet.* 135:263-267.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2007). Dirección de censos y demografía. Colombia una nación multicultural. Su diversidad étnica <http://www.dane.gov.co/>.
- Fenech M. (2001) The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat. Res.* 475: 57-67.
- Fillon-Emery N., Chango A., Mircher C., Barbé F., Bléhaut H., Herbeth B., Rosenblatt D.S., Réthoré M.O., Lamber D., Nicolas J.P. (2004) Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1551-1558.
- Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J.H., den Heijer M., Kluijtmans L.A.J., van den Heuvel L.P., Rozen R. (1995) A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10:111-113.
- González-Galofre Z., Villegas V., Martínez-Agüero M. (2010) Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. *Rev. Cienc. Salud.* 8 (1): 7-21.
- Guéant J.L., Anello G., Bosco P., Guéant-Rodríguez R.M., Romano A., Barone C., Gérard P., Romano C. (2005) Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76:706-709 doi:10.1136/jnnp.2004.039875.
- Guéant-Rodríguez R.M., Guéant J.L., Debarb R., Thirion S., Hong L.X., Bronowicki J.P., Namour F., Chabi N.W.,

- Sanni A., Anello G., Bosco P., Romano C., Amouzou E., Arrieta H.R., Sánchez B.E., Romano A., Heberth B., Guiland J.C., Mutchinick O.M. (2006) Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am.J. Clin. Nutr.* 83(3); 701-707.
- Hobbs C.A., Cleves M.A., Lauer R.M., Burns T.L., James S.J. (2002) Preferential transmission of the MTHFR 677T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am. J. Med. Genet.* 15; 113(1): 9-14.
- Hobbs C.A., Sherman S.L., Yi P., Hopkins E., Torfs C.P., Hine R.J., Pogribna M., Rozen R., James S.J. (2000) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 623-630.
- Isotalo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G. (2000) Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 986-999.
- Lardoeyt F.N., Tabeada L.N., Torres S.Y., Viñas P.C. (2005) Fundamentos del ácido fólico en la prevención primaria farmacológica de defectos congénitos. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr* 21:1-2.
- Leclerc D., Wilson A., Dumas R. (1998) Cloning and mapping of cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3059-3064.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80: 6606-6610.
- Li D.H., Ahmed M., Li Y.N., Jiao L., Chou T.H., Wolff R.A., Lenzi R., Evans DB., Bondy ML., Pisters PW., Abbruzzes JL., Hassan M.M. (2005) 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and the Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer. Epidem. Biomar.* 14: 1470-1476.
- Licastro F, Marocchi A., Penco S., Porcellini E., Lio D., Dogliotti G., Corsi M.M. (2006) Does Down's syndrome support the homocysteine theory of atherogenesis? Experience in elderly subjects with trisomy 21. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 43: 381-387.
- Lupo P., Goldmuntz F., Mitchell L. (2010) Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway and the risk of conotruncal heart defects. *J. Biomed. Biotechnol* ID 630940. doi:10.1155/2010/630940.
- Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Yi P., James S.J. (2000) Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection; alterations with plasma homocysteine and peroxidal 5'phosphate concentrations. *Clin. Chem.* 46(2):265-72.
- Monsalve M.V., Salzano F.M., Rupert J.L., Hutz M.H., Hill K., Hurtado A.M., Hochachka P.W., Devine W.D.V. (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) allele-frequencies in Amerindians. *Ann. Hum. Genet.* 67(4): 367-371.
- Ogino S., Wilson R.B. (2003) Genotype and haplotype distributions of *MTHFR* 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J. Hum. Genet.* 48(1) 0001-0007
- O'Leary V.B., Parle-McDermott A., Molloy A.M., Kirke P.N., Johnson Z., Conley M., Scott J.M., Mills J.L. (2002) MTRH and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 107 (2): 151-155
- Ouyang S., Li Y., Liu Z., Chang H., Wu J. (2013) Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: A meta-analysis. *Gene.* 515: 308-312
- Pogribny I.P., Basankian A.G., Miller B.J., Lopatina N.G., Poirier L.A., James S.J. (1995) DNA breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient rats. *Cancer. Res.* 55:1894-1901.
- Pogribny I.P., Miller B.J., James S.J. (1997) Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumour progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett.* 115: 31-38.
- Pozzi E., Vergani P., Dalprà L., Combi R., Silvestri

- D., Crosti F., Dell'Orto M., Valsecchi M.G. (2009) Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200:636: e1-6.
- Rady P.L., Szucs S., Grady J., Hudnall S.D., Kellner L.H., Nitowsky H., Tying S.K., Matalon R.K. (2002) Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am. J. Med. Genet.* 107:162-8.
- Scala I., Granese B., Sellitto M., Salome S., Sammartino A., Pepe A., Mastroiacovo P., Sebastio G., Andria G. (2006) Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet. Med.* 8: 409-416.
- Sherman S.L., Freeman S.B., Allen E.G., Lamb N.E. (2005) Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet. Genome Res.* 111:273-280
- Sherman S.L., Allen M.G., Bean L.H., Freeman S.B. (2007) Epidemiology of Down syndrome. *Ment. Retard. Dev. D. R.* 13: 221 - 227.
- Shi M., Caprau D., Romitti P., Christensen K., Murray J.C. (2003) Genotype Frequencies and Linkage Disequilibrium in the CEPH Human Diversity Panel for Variants in Folate Pathway Genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. *Birth Defects Res. Part A.* 67:545-549
- Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22 (15): 1928-1929.
- Spencer K. (2001) What is the true fetal loss rate in pregnancies affected by trisomy 21 and how does this influence whether first trimester detection rates are superior to those in the second trimester. *Prenat. Diagn.* 21: 788-789.
- Stuppia L., Gatta V., Gaspari A.R., Antonucci I, Morizio E., Calabrese G., Palka G. (2002) C677T mutation in the 5,10 MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (6): 388-90.
- Ulvik A., Ueland P.M., Fredriksen A., Meyer K., Vollset S.T., Hov G., Schneede J. (2007) Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum. Genet.* 121:57-64
- Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R. (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 64:169-72
- Wiemels J.L., Smith R.N., Taylor G.M., Eden O.B., Alexander F.E., Greaves M.F. (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:4004-4009
- Wilson A., Platt R., Wu Q., Leclerc D., Christensen B., Yang H., Gravel R.A., Rozen R. (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol. Genet. Metab.* 67:317-323
- Wu X., Wang X., Chan Y., Jia S., Luo Y., Tang W. (2013) Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome offspring: a meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gyn. R B.* 167:154-159
- Xu G.L., Bestor T.H., Burchis D., Hsieh C.L., Tommerup N., Bugge M., Hulten M., Qu X.Y., Russo T.T., Veigas-Pequignot E. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402:187-191
- Yanamandra K., Bocchini J.A., Thurmon T.F. (2003) Absence of association of fetal MTHFR C677T polymorphism with prenatal Down syndrome pregnancies. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 5

AGRADECIMIENTOS

A los padres y acudientes. A los directores de los cuatro Centros de educación especial de Risaralda y Quindío, Región Cafetera de Colombia. A la Vicerrectoría de Investigaciones Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo financiero del proyecto.

ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS AND THEIR UTILITY IN SELECTION FOR SEED PRODUCTION IN *Phalaris aquatica* L.

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS Y SU UTILIDAD PARA LA SELECCIÓN POR PRODUCCIÓN DE SEMILLA EN *Phalaris aquatica* L.

Spara, F.¹, Abbott, L.², Wolff, R.¹, Vernengo, E.¹

¹Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján.

²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján.

ferspara@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Phalaris aquatica L. (harding grass) is a perennial forage grass, which shows hardiness even in less favorable environments and that provides a high nutritional quality herbage mass. This species is a heterogeneous allogamous tetraploid, presenting great genotypic variability. The object of the present study was to determine genetic parameters for morphologic and reproductive characters during three years, and to evaluate the expected advances in selection for higher seed production. A progeny test of 10 clones was carried out during 2010, 2011 and 2012 in a completely randomized design with three replications. The characters measured were: number of panicles per plant (NP), flag leaf length (LHB), flag leaf width (AHB), panicle length (LP), panicle weight (PP), number of seeds per panicle (NS) and 1000 seeds weight (P1000). Repeatability, minimum number of measurements to predict the real value of the individual, heritability in broad sense and phenotypic correlations were estimated. According to the parameter estimated, ANOVA and Pearson coefficient were used. The characters with high repeatability were AHB (0.70), LP (0.88) and P1000 (0.88), with a minimum number of two measurements required and 80% of confidence. Heritability (H^2) values were high for all characters and for the three years (0.68–0.99). Phenotypic correlations between the following characters were statistically significant, positive and high: PP and NS (0.86–0.93), LHB and AHB (0.56–0.82), and LHB and LP (0.48–0.63). Trusty values for most of the genetic parameters were obtained, and their utility in selection for seed production was discussed.

Key words: repeatability, heritability, phenotypic correlation, harding grass

RESUMEN

Phalaris aquatica L. (falaris bulbosa) es una forrajera perenne que posee rusticidad aún en ambientes poco favorables, produciendo una masa de forraje de excelentes propiedades nutricionales. Esta especie es tetraploide, alógama y heterogénea, y presenta gran variabilidad genotípica. El objetivo del presente estudio fue determinar parámetros genéticos para caracteres morfológicos y reproductivos durante tres años. Se realizó una prueba de progenie con 10 clones durante 2010, 2011 y 2012 en un DBCA con tres repeticiones. Los caracteres medidos fueron: número de panojas por planta (NP), largo de hoja bandera (LHB), ancho de hoja bandera (AHB), largo de panoja (LP), peso de panoja (PP), número de semillas por panoja (NS) y peso de 1000 semillas (P1000). Se estimó la repetibilidad, el número mínimo de mediciones para predecir el valor real del individuo, la heredabilidad en sentido amplio y la correlación fenotípica. De acuerdo al parámetro estimado se usó ANOVA y el coeficiente de Pearson. Los caracteres con mayor repetibilidad fueron AHB (0,70), LP (0,88) y P1000 (0,88), requiriéndose un mínimo de dos mediciones para obtener un 80% de confiabilidad. La heredabilidad en sentido amplio fue alta para todos los caracteres y para los tres años (entre 0,68 y 0,99). La correlación fenotípica fue estadísticamente significativa, positiva y alta entre los siguiente caracteres: PP y NS (0,86–0,93), LHB y AHB (0,56–0,82), y LHB y LP (0,48–0,63). Se pudieron obtener valores confiables para la mayoría de los parámetros genéticos y se discute su utilidad para selección por producción de semilla.

Palabras clave: repetibilidad, heredabilidad, correlaciones fenotípicas, falaris bulbosa

Fecha de recepción: 11/10/2013

Fecha de aceptación de versión final: 19/05/2014

INTRODUCCIÓN

Phalaris aquatica L., syn *Phalaris tuberosa* var. *stenoptera* (Hack) Hitch., conocida comúnmente en Argentina como falaris bulbosa, es una forrajera de ciclo otoño-invierno-primaveral que fue introducida al país a fines del siglo XIX por Carlos Spegazzini (Maddaloni y Bertín, 1990). Como gramínea forrajera, se la reconoce por su aptitud productiva, fundamentalmente en la estación fría del año, cuando muchas de las especies templadas están en reposo. Asimismo, posee una longevidad y rusticidad destacables aún en ambientes poco favorables, entregando un forraje de excelentes propiedades nutricionales (Carámbula, 1981; Bertín, 1988; Mazzanti *et al.*, 1992). Sin embargo, la superficie sembrada con esta especie ha ido declinando paulatinamente en nuestro país en las últimas décadas, cuyas causas se atribuyen a una baja capacidad de implantación, a la maduración desapareja de las panojas y a la baja retención de la semilla (Carámbula, 1981; Scheneiter *et al.*, 1990; Bertín y Rosso, 1991). El bajo crecimiento inicial que presenta esta especie, constituye una significativa limitante para su utilización en siembras de pasturas junto a otras forrajeras debido a su escasa habilidad competitiva, lo que conduce a una pobre eficiencia de implantación. Por otro lado, las dificultades para lograr una buena cantidad de semilla a cosecha, determinan que el valor de la misma en el mercado sea comparativamente más elevado que el de otras especies (McWilliam y Schroeder, 1974; Costa, 1982; Oram, 1982; Bertín y Rosso, 1991; Mazzanti *et al.*, 1992; Rosso y Bertín, 1995).

Esta forrajera perenne, se caracteriza por una alta variabilidad debida a su constitución genética tetraploide, a su reproducción alógama y a su naturaleza poco homogénea. Según diversos autores nacionales y extranjeros, el proceso de domesticación de falaris es relativamente reciente, por lo que conserva algunas características propias de las especies no cultivadas, las que suelen presentar estrategias para su supervivencia vinculadas con la dispersión de su semilla (Oram *et al.*, 1985).

En tal sentido es de hacer notar que países como Australia y Nueva Zelanda, considerados de tecnología avanzada en lo que concierne al manejo de las complejas relaciones clima-suelo-pastura-animal, propias de los sistemas pastoriles, han mantenido una activa investigación ligada al mejoramiento genético de los recursos forrajeros, entre ellos el falaris (CSIRO, 1990; DSIR, 1990; Burgon *et al.*, 1997; Oram *et al.*, 2009).

Los australianos han trabajado mucho en la retención para mejorar la cantidad y calidad de la semilla en esta especie (McWilliam, 1963; McWilliam y Schroeder, 1974; Oram, 1982). McWilliam y Schroeder (1965), trabajando sobre el cultivar El Gaucho INTA introducido desde la Argentina, obtuvieron la variedad Siro Seedmaster, que presenta una importante capacidad de retención de semilla. Kelman y Culvenor (2003) encontraron una correlación genética significativa y negativa entre retención de semilla y fragmentación de la panoja ($r = -0,71 \pm 0,19$).

Clements y Latter (1973) hallaron que la selección para mayor peso de la semilla, estuvo correlacionada positivamente con el aumento de peso de la plántula y con el tamaño de las hojas. En tal sentido, los mismos autores lograron respuestas estadísticamente significativas en tres ciclos de selección para los caracteres peso de la semilla, vigor de plántula, tamaño de la hoja y tasa de aparición de hojas; todos ellos vinculados a lograr una mejor implantación en la pastura.

También, en la Argentina se registra un periodo en que hubo avances en el mejoramiento de la producción de semilla de esta especie, cuyas primeras contribuciones significativas se debieron al Ing. Agr. Serrano al obtener el cultivar El Gaucho MAG (1957). Sin embargo, en la provincia de Buenos Aires la producción de semilla de falaris presenta comportamientos que aún no son satisfactorios.

En la Universidad Nacional de Luján se viene realizando el mejoramiento genético de esta forrajera desde el año 1993, habiendo obtenido la variedad sintética Bilbo UNLu en 1999 (Vernengo y Piroddi, 1999). Esta variedad fue seleccionada a partir de clones provenientes de viejas pasturas y de los cultivares Castelar INTA, Grasslands Maru y Urunday, siendo su característica sobresaliente la elevada producción de forraje, habiendo superado en ensayos de producción a los cultivares El Gaucho, Holdfast, Siroso, Sirolan y Castelar (Vernengo *et al.*, 1995; 2000 y 2003). En 2012 se obtuvo el cultivar Cacique (*P. aquatica* L.). A partir de estos trabajos de selección, se cuenta con material genético que, en evaluaciones clonales y en pruebas de progenie, han presentado comportamientos superiores a los cultivares comerciales en lo que concierne a vigor inicial, producción forrajera y rendimiento de semilla.

Sin embargo, debido a la naturaleza poco homogénea que caracteriza a esta especie, surgió el interés por evaluar los parámetros genéticos clásicos en las poblaciones y

condiciones ambientales de la zona de Luján (Buenos Aires).

El objetivo, por tanto, fue estimar durante tres años los siguientes parámetros genéticos: repetibilidad, heredabilidad en sentido amplio y correlación fenotípica para caracteres morfológicos y reproductivos en materiales genéticos seleccionados en Luján. Esto incluye el análisis de los resultados en relación a lo que se espera en el avance por selección para lograr una mayor producción de semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se condujo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Luján, situado a 34° 36' S y 59° 04' W, sobre un suelo Argiudol típico clase II w, bien provisto de materia orgánica (3,65%) y nitrógeno total (0,19%), moderadamente ácido en superficie (pH 5,6) y con una disponibilidad de fósforo de 8 ppm. El clima se caracteriza por ser templado y húmedo, aunque durante el año 2011 se registraron escasas lluvias, provocando una sequía importante desde octubre hasta fines de ese año.

El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizado (DBCA) con 3 repeticiones, con plantas espaciadas a 1 m en ambas direcciones. Las mediciones se realizaron sobre 10 clones (madres) y sus progenies (hijas), durante 2010, 2011 y 2012.

Los caracteres morfológicos y reproductivos medidos en cada planta fueron: número de panojas por planta (NP); largo de hoja bandera (LHB) medida desde la lígula hasta el extremo; ancho de hoja bandera (AHB) medido a un cm de la lígula; largo de panoja (LP); peso de panoja (PP); número de semillas por panoja (NS) y peso de 1000 semillas (P1000). Los caracteres LHB, AHB y LP se midieron en cm y PP y P1000 en g. Según el carácter evaluado, el dato por planta es el valor promedio de varias mediciones. Las mediciones se realizaron en noviembre y diciembre de 2010, 2011 y 2012. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2008).

Repetibilidad

La repetibilidad se define como el coeficiente de correlación entre medidas repetidas sobre un mismo individuo, por ejemplo cada año en la misma estación. Esto permite reducir la incidencia del ambiente temporario respecto al genotipo evaluado. Su valor varía de 0 a 1, siendo 1 cuando

el carácter se expresa con máxima constancia (Resende, 2002). Valores altos de repetibilidad para determinado carácter indican que es posible predecir el valor real del individuo utilizando un número relativamente pequeño de mediciones (Cargnelutti *et al.*, 2004).

El coeficiente de repetibilidad (R) fue obtenido por medio del método de análisis de varianza según la siguiente fórmula (Cruz *et al.*, 2004):

$$R = \frac{\frac{CM_C - CM_E}{n}}{\frac{CM_C - CM_E}{n} + CM_E}$$

CM_C = cuadrado medio de los clones, CM_E = cuadrado medio del error, n = número de mediciones.

El coeficiente de determinación genotípica (R^2) que representa la certeza de la predicción del valor real de los individuos seleccionados, en base a las mediciones (n) realizadas fue obtenido con la siguiente fórmula:

$$R^2 = \frac{n * R}{1 + R(n - 1)}$$

El número mínimo de mediciones (n_0) para predecir el valor real de los individuos, con base a un coeficiente de determinación genotípica (R^2) preestablecido (80, 85, 90 y 95%) fue calculado según la siguiente fórmula (Cruz *et al.*, 2004):

$$n_0 = \frac{R^2(1 - R)}{(1 - R^2)R}$$

Heredabilidad

La heredabilidad en sentido amplio H^2 fue estimada como la relación entre la varianza genética y la varianza fenotípica según Vencovski (1969), Falconer y MacKay (1997):

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_F^2}$$

$$\sigma_G^2 \text{ Varianza genética} = \frac{CM_C - CM_E}{r}$$

$$\sigma_F^2 \text{ Varianza fenotípica} = \frac{CM_C}{r}, \quad CM_C =$$

cuadrado medio de los clones,

CM_E = cuadrado medio del error,

r = repeticiones.

Correlaciones fenotípicas

La estimación de las correlaciones fenotípicas entre los caracteres se realizó utilizando el coeficiente de Pearson.

Interacción genotipo x ambiente

Para medir la interacción G x E, los datos obtenidos en los tres años fueron analizados mediante un ANOVA de manera combinada, de acuerdo al siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + A_j + (CA)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde, Y_{ij} = valor medio del clon i en el ambiente j ; μ = media general; C_i = efecto del clon i donde $i = 1-10$; A_j = efecto del año j (ambiente) donde $j = 1-3$; $(CA)_{ij}$ = efecto de la interacción del clon i con el año j ; ε_{ij} = efecto aleatorio o error experimental.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores promedio, mínimos, máximos y coeficientes de variación de los caracteres estudiados para cada año analizado. En las Figuras 1 y 2 se presentan los datos de las temperaturas y precipitaciones de los años analizados y la media histórica. En la Tabla 2 se observan los resultados de la interacción G x E, que fue estadísticamente significativa para todos los caracteres, excepto LHB y PP.

La sequía de 2011 y el exceso de precipitaciones en la primavera de 2012 produjeron consecuencias no previstas en el desarrollo de las plantas, como se observa en los estadísticos de la Tabla 1.

En la Tabla 3 se presenta el análisis de varianza que muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los clones para los siete caracteres estudiados en los tres años, excepto para el ancho de hoja bandera en el tercer año.

Repetibilidad

Los valores de repetibilidad, del coeficiente de determinación genotípica y del número de mediciones n_0 de los caracteres evaluados se presentan en la Tabla 4. Los caracteres que mostraron mayor repetibilidad fueron largo de

Tabla 1. Estadísticas descriptivas de los tres años analizados: valores de las medias, mínimos, máximos y coeficientes de variación (CV) de los caracteres morfológicos y reproductivos de *Phalaris bulbosa* (*P. aquatica* L.).

Estadístico	Año	Caracteres medidos						
		NP	LHB (cm)	AHB (cm)	LP (cm)	PP (g)	NS	P1000 (g)
Media	2010	94	13,19	1,14	9,38	1,72	414	1,78
	2011	123	5,51	0,53	8,87	8,37	173	1,63
	2012	141	9,13	0,72	8,42	9,75	258	1,69
Valores mínimos	2010	53	8,45	0,74	7,20	0,87	202	1,25
	2011	88	2,74	0,36	6,70	5,04	95	1,38
	2012	55	4,00	0,30	6,30	4,94	64	1,35
Valores máximos	2010	138	17,50	1,90	11,90	2,90	664	2,62
	2011	166	8,90	0,90	11,37	13,88	332	2,09
	2012	201	13,03	1,10	12,25	13,65	377	1,98
CV	2010	19,51	20,95	23,79	13,69	31,68	30,06	18,64
	2011	16,11	30,93	24,81	13,15	32,00	39,36	11,46
	2012	25,58	27,37	30,38	17,41	24,73	33,41	10,99

NP: número de panojas por planta, LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

panoja (0,88), peso de 1000 semillas (0,88) y ancho de hoja bandera (0,70), todos con un elevado coeficiente de determinación genotípica (> 87%). El carácter con menor repetibilidad fue el peso de la panoja (0,37).

Heredabilidad

Los valores de heredabilidad para los tres años analizados se encuentran en la Tabla 5. La heredabilidad en sentido amplio fue alta para todos los caracteres y para los tres años (entre 0,68 y 0,99), excepto para el ancho de hoja bandera en el 2012 en el que no se pudo estimar porque el

resultado del ANOVA no fue estadísticamente significativo (Ver Tabla 3).

Correlaciones fenotípicas

Las correlaciones fenotípicas entre los caracteres estudiados se presentan en la Tabla 6. Las correlaciones que presentaron valores estadísticamente significativos, positivos y altos en los tres años fueron el peso de panoja con el número de semillas por panoja (0,86 a 0,93), el largo de la hoja bandera con el ancho de la hoja bandera (0,56 a 0,82) y el largo de hoja bandera con el largo de la panoja (0,48 a 0,63).

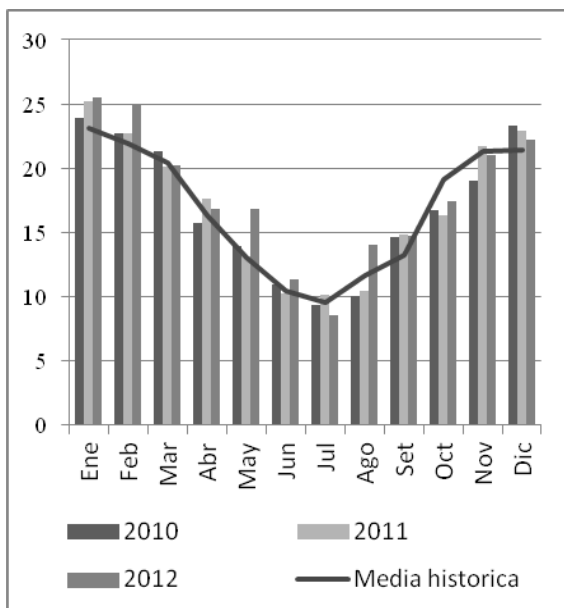


Figura 1. Temperatura media mensual y media histórica (°C) de 2010, 2011 y 2012.

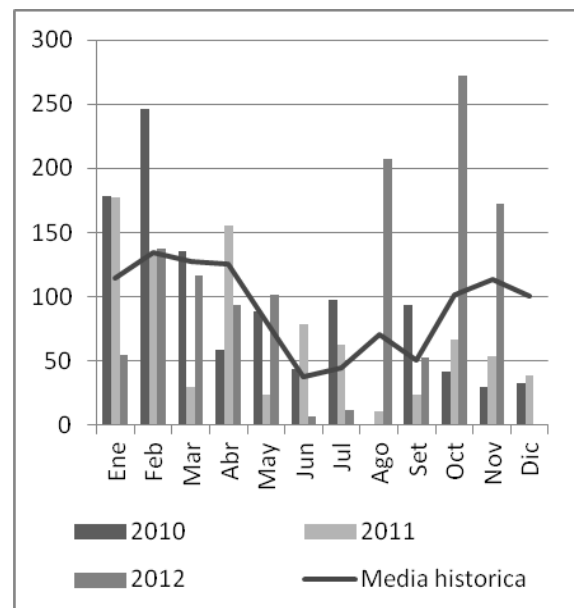


Figura 2. Precipitación media mensual y media histórica (mm) de 2010, 2011 y 2012.

Tabla 2. Análisis de la varianza para estimar la interacción genotipo x ambiente (G x E) para los siete caracteres estudiados en *Phalaris aquatica* L.

FV	Caracteres medidos													
	NP		LHB		AHB		LP		PP		NS		P1000	
	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Año (A)	22154,34	0,0001	442,59	0,0001	2,85	0,0001	12,07	0,0001	585,23	0,0001	446410,71	0,0001	0,18	0,0008
Clon (C)	1932,13	0,0001	29,69	0,0001	0,24	0,0001	7,33	0,0001	16,43	0,0001	33268,07	0,0001	0,30	0,0001
AxC	850,89	0,0040	1,59	0,0925	0,05	0,0004	1,25	0,0025	4,60	0,0947	12113,59	0,0002	0,06	0,0015
Error	338,82		2,26		0,02		0,47		2,91		3628,08		0,02	

NP: número de panojas por planta, LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

Tabla 3. Análisis de la varianza para los siete caracteres estudiados en falaris bulbosa (*P. aquatica* L.) en 2010, 2011 y 2012.

Año	FV	Caracteres medidos													
		NP		LHB		AHB		LP		PP		NS		P1000	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
2010	Clon	725,35	0,0023	20,25	0,0001	0,22	0,0001	4,40	0,0001	0,83	0,0001	41731,10	0,0001	0,26	0,0003
	Error	159,03		1,96		0,01		0,41		0,06		3714,47		0,04	
2011	Clon	697,22	0,0295	8,45	0,0001	0,05	0,0001	3,39	0,0001	20,63	0,0001	11796,68	0,0001	0,11	0,0003
	Error	225,40		0,41		0,004		0,48		1,13		1424,77		0,003	
2012	Clon	2908,55	0,0017	14,09	0,0011	0,07	0,1036	5,68	0,0001	13,02	0,0012	17487,87	0,0004	0,11	0,0001
	Error	603,80		2,72		0,04		0,56		2,57		2888,10		0,002	

NP: número de panojas por planta, LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

Tabla 4. Valores del coeficiente de repetibilidad (R), de determinación genotípica (R^2) y número de mediciones (n_0) para obtener una confiabilidad entre 80 y 95% para los caracteres morfológicos y reproductivos de falaris bulbosa (*P. aquatica* L.) evaluados en 2010, 2011 y 2012.

Carácter	R	R^2 (%)	N_0 Confiabilidad (%)			
			80	85	90	95
			NP	0,61	82,43	3
LHB	0,65	84,78	3	4	5	11
AHB	0,70	87,50	2	3	4	9
LP	0,88	95,65	1	1	2	3
PP	0,37	63,79	7	10	16	33
NS	0,63	83,63	3	4	6	12
P1000	0,88	95,65	1	1	2	3

NP: número de panojas por planta, LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

Tabla 5. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) para los siete caracteres estudiados en falaris bulbosa (*P. aquatica* L.) en 2010, 2011 y 2012.

Carácter	H^2		
	2010	2011	2012
NP	0,78	0,68	0,79
LHB	0,90	0,95	0,81
AHB	0,99	0,88	-
LP	0,90	0,86	0,90
PP	0,93	0,94	0,80
NS	0,91	0,88	0,83
P1000	0,79	0,98	0,98

NP: número de panojas por planta, LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

Tabla 6. Correlaciones fenotípicas entre caracteres reproductivos y morfológicos de *falaris bulbosa* (*P. aquatica* L.) para 2010, 2011 y 2012.

Año	Carácter	AHB	LP	PP	NS	P 1000
2010	LHB	0,71**	0,58**	0,02	0,22	-0,38*
2011		0,82**	0,63**	-0,14	-0,33	-0,29
2012		0,56**	0,48**	0,23	0,25	-0,07
2010	AHB		0,21	0,07	0,30	-0,35
2011			0,53**	-0,06	-0,17	-0,23
2012			0,09	-0,04	0,04	-0,35
2010	LP			0,26	0,36	-0,13
2011				0,12	-0,05	-0,41*
2012				0,35	0,41**	-0,16
2010	PP				0,86**	0,60**
2011					0,88**	-0,61**
2012					0,93**	0,36*
2010	NS					0,31
2011						0,48**
2012						0,18

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

LHB: largo de hoja bandera, AHB: ancho de hoja bandera, LP: largo de panoja, PP: peso de panoja, NS: número de semillas por panoja y P1000: peso de 1000 semillas.

DISCUSIÓN

Es importante mencionar que la variabilidad que caracteriza esta especie también se presenta entre los clones seleccionados en Luján. Esto se manifiesta de manera notable en la forma y estructura de las panojas, carácter que está muy relacionado con la producción eficiente de semillas. Así por ejemplo, hay clones con panojas cortas y compactas, mientras otros tienen panojas largas y más laxas.

Los resultados obtenidos en el número de panojas por planta fueron inferiores a los informados por Rosso y Bertín (1995), cuya media fue de 258 panojas/m² en promedio de cuatro años. La menor cantidad de macollos en 2010 se puede explicar porque las plantas fueron clonadas en ese año y la posibilidad de generar macollos reproductivos fue menor. Se realizó un corte de biomasa a principios de julio de 2011 que pudo perjudicar la emisión de panojas. Castaño (2005) encontró que un cultivo de *falaris* defoliado a mitad de julio reduce el número de panojas/m². A ello se sumó el período de sequía que se produjo durante la diferenciación de los ápices y el comienzo de elongación de los macollos reproductivos.

En el carácter largo de panoja, en 2011 se observó una mayor incidencia de la fragmentación y el desprendimiento de las ramificaciones de la panoja a causa del período de sequía que se produjo entre octubre y diciembre. Esto afectó el largo de la panoja ya que muchas de ellas se encontraban sin el tercio superior, especialmente en los materiales con panojas largas y laxas.

Las diferencias de peso de panoja entre y dentro de los años se podrían explicar por la gran heterogeneidad en la emisión de las inflorescencias, presentando un rango de peso de las panojas muy amplio.

Bertín y Rosso (1991) citan que los procesos formativos de la semilla (polinización, fecundación y desarrollo de las semillas) se ven afectados por las condiciones climáticas, observándose esto claramente cuando se comparan las tres campañas. *Falaris* es una especie de semilla muy caediza y de maduración heterogénea; esto se intensifica con condiciones climáticas adversas. En 2011, la cantidad de semillas por panoja disminuyó en una alta proporción, causada por un golpe de calor sobre las flores, lo que provocó la dis-

minución del cuajado y la desecación del polen. Además, el periodo de sequía durante octubre y diciembre afectó la floración y maduración de la semilla. Carámbula (1981) cita que el déficit hídrico limita el número de flores por inflorescencia y promueve la dehiscencia de la semilla. En 2012, el bajo número de semillas por panoja se debió a que el polen fue lavado por las intensas lluvias durante el período de floración.

Los valores de peso de mil semillas en este trabajo son superiores a los citados por varios autores (Bertín, 1988; Serrano *et al.*, 1991, Bertín *et al.*, 1992; Castaño, 2005). Serrano *et al.* (1991) citan que el peso de 1000 semillas estaría relacionado con el nivel de nitrógeno del suelo y las condiciones climáticas durante el lapso de llenado de las semillas, pudiendo variar en 0,5 g las 1000 semillas. Observando los valores máximos y mínimos, el P1000 fluctuó marcadamente en un amplio rango de valores.

Siendo *P. aquatica* L. una especie perenne permite obtener mediciones repetidas, por lo cual se consideró útil aplicar el coeficiente de repetibilidad a los datos obtenidos, a fin de conocer el grado de confianza que se les puede otorgar a las mediciones en el momento de seleccionar los individuos.

El menor valor de repetibilidad del carácter peso de panoja se puede atribuir a que las panojas (en especial las más largas y laxas) tienden a desarticularse a la madurez y por tanto a perder la semilla. Los resultados de este análisis permiten poner en evidencia la naturaleza variable en la expresión de varios de los caracteres estudiados.

Con una, dos o tres mediciones repetidas por individuo se obtiene un 80% de confiabilidad para todos los caracteres, excepto para peso de la panoja para el cual deben tomarse siete mediciones por individuo.

El coeficiente de repetibilidad es muy útil en este tipo de plantas perennes, porque orienta la selección en cuanto a la confiabilidad de los valores obtenidos. En este experimento los resultados son satisfactorios para todos los caracteres excepto para el peso de la panoja.

La unidad que el mejorador debe manejar es el individuo, no lo son el o los caracteres por los que se selecciona a través de los mecanismos de la reproducción. Se espera entonces que, al seleccionar por un determinado carácter, otros caracteres asociados también se vean afectados.

En este trabajo también se analizaron las correlaciones genéticas y ambientales, pero se pudo comprobar que

debido a las razones atribuibles a la variabilidad que presenta esta especie y de los factores climáticos, un análisis más complejo mediante el método de covarianza cruzada entre caracteres (Becker, 1984) no brindó la confiabilidad esperada. Por eso no se incluyeron en este trabajo.

Como es sabido, ninguno de los parámetros estimados es una constante biológica del carácter, dado que su valor depende de la composición genética de la población de partida, de las circunstancias ambientales a las cuales estuvo sometida y del diseño experimental utilizado (Rimieri y Wolff, 2010).

Se pudieron obtener valores confiables para la mayoría de los parámetros genéticos medidos, aún considerando la influencia adversa de los factores climáticos sobre la producción de semillas. Los caracteres que presentaron altos valores de repetibilidad y heredabilidad permiten pronosticar una buena respuesta a la selección.

Como el objetivo es aumentar la producción de semilla, los caracteres que en esta región y con los materiales genéticos estudiados permitirían una mejora genética por selección serían principalmente el peso de la panoja y el número de semillas por panoja, ambos correlacionados positivamente entre sí.

Si bien en este experimento se pudo observar que la repetibilidad del carácter peso de panoja fue baja, entre los clones seleccionados algunos poseen panojas compactas, que se fragmentan poco y retienen más la semilla, de modo que habría que estimar nuevamente la repetibilidad en ese grupo. Probablemente se obtengan valores mayores, que permitan lograr una elección más eficiente de los mejores individuos para este carácter. Al respecto se ha tomado como antecedente a Kelman and Culvenor (2003), que obtuvieron una elevada correlación negativa entre retención y fragmentación de la panoja.

Respecto a los abundantes e importantes aportes de las investigaciones realizadas en Australia y Nueva Zelanda, mencionados en la Introducción (McWilliam, 1963; McWilliam y Schroeder, 1965; Clements y Latter, 1973; McWilliam y Schroeder, 1974; Oram, 1982; Kelman y Culvenor, 2003), cabe comentar que los objetivos no siempre coinciden con los buscados en nuestro país, en lo que respecta al aumento de rendimiento de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- Becker W.A. (1984) Manual of Quantitative Genetics. Academic Enterprises. Pullman, Washington.
- Bertín O. (1988) Características agronómicas de los principales grupos de cultivares de falaris bulbosa. INTA-EEA Pergamino. Información General N° 146: 1-3.
- Bertín O., Rosso, B. (1991) Evaluación de cultivares de *Phalaris aquatica* L. en la producción de semilla. INTA-EEA Pergamino. Informe Técnico N° 249: 1-14.
- Bertín O., Rosso B., Font A. (1992) Determinación del momento óptimo para la cosecha de semilla de falaris bulbosa. INTA-EEA Pergamino. Información Parcial 267: 1-4.
- Burgon A., Bondesen O.B., Verburgt W.H., Hall A.G., Bark N.S., Robinson M., Timm G. (1997) In: D.T. Fairey and J.H. Hampton (Ed.) Forage Seed Production. Vol. I: Temperate Species. pp. 271-310.
- Carámbula M. (1981) Producción de semillas de plantas forrajeras. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.
- Cargnelutti Filho A., Castilhos Z.M.S., Sorck L., Saviam J.F. (2004) Análise de repetibilidade de caracteres forrageiros de genótipos de *Panicum maximum*, avaliados com e sem restrição solar. Ciência Rural, Santa Maria. 34: 723-729.
- Castaño J. (2005) Producción de semillas forrajeras en el sudeste bonaerense. INTA-EEA Balcarce. Materiales Didácticos N° 10: 77 pp.
- Clements R.J., Latter B.D.H., (1973) Responses to selection for seed weight and seedling vigour in *Phalaris*. Australian Journal of Agricultural Research. Vol. 25: 33-44.
- Costa M.C. (1982) Mejoramiento genético en *Phalaris aquatica* L. Est. Exp. Agrop. Concepción del Uruguay. INTA. Serie Producción Vegetal. Boletín Técnico N° 16. 16 pp.
- Cruz C.D., Regazzi A.J., Carneiro P.C.S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 4° ed. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa.
- CSIRO (Division of Plant Industry) (1990) Holdfast *Phalaris*: a new pasture grass cultivar. pp. 2.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008) InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DSIR (New Zealand Department of Scientific and Industrial Research) (1990) DSIR Grassland Range Cultivars. Palmerston North. New Zealand, pp. 34.
- Falconer D.S., MacKay F.C. (1997) Introduction to Quantitative Genetics. 4° Edition. Longman Pub Group, New York.
- Kelman W.M., Culvenor R.A. (2003) The genetic correlation of panicle shattering with the intact rachilla form of seed retention in *Phalaris aquatica* L. W. Euphytica 130: 405-411.
- Maddaloni J., Bertín O. (1990) Las gramíneas forrajeras utilizadas en las pasturas perennes del norte de la provincia de Buenos Aires. INTA-EEA Pergamino. Boletín de Divulgación Técnica N° 82: 7-10.
- Mazzanti A., Castaño J., Sevilla G., Orbea J. (1992) Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras. INTA-EEA Balcarce, Manual de Descripción: 28-31.
- McWilliam J.R. (1963) Selection for seed retention in *Phalaris tuberosa* L. Australian Journal of Agricultural Research. Vol 14: 755-764.
- McWilliam J.R., Schroeder H.E. (1965) Seedmaster: a new cultivar of *phalaris* with high seed retention. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 31: 313-315.
- McWilliam J.R., Schroeder H.E. (1974) The yield and quality

- of *Phalaris* seed harvested prior to maturity. Australian Journal of Agricultural Research. Vol. 25: 259-264.
- Oram R.N. (1982) Genetics of total seed yield and its components in *Phalaris aquatica* L. Australian Journal of Agricultural Research. Vol. 33: 465-471.
- Oram R.N., Schroeder H.E., Culvenor R.A. (1985) Domestication of *Phalaris aquatica* L. as a pasture grass. XV International Grassland Congress: 220-221.
- Oram R.N., Ferreira V., Culvenor R.A., Hopkins A.A., Stewart A. (2009) The first century of *Phalaris aquatica* L. cultivation and genetic improvement: a review. Crop and Pasture Science 60: 1-15.
- Resende M.D.V. (2002) Genética, biométrica e estatística no melhoramento de plantas perennes. Embrapa Informacao Tecnológica, Brasília.
- Rimieri P., Wolff R. (2010) La genética y el estado actual de la obtención y adopción de cultivares forrajeros en Argentina. BAG, Journal of Basic and Applied Genetics. V. 21 (2): 1-7 (www.scielo.org.ar/scielo).
- Rosso B., Bertín O. (1995) Determinación del momento óptimo para la cosecha de falaris bulbosa (*Phalaris aquatica* L.). EEA-INTA Pergamino. Informe Técnico N° 305: 1-12.
- Scheneiter O., Bertín O., Carrete J. (1990) Establecimiento a campo de dos cultivares de falaris bulbosa. EEA-INTA Pergamino. Forrajeras y Producción Bovina. Información Parcial N° 226: 1-3.
- Serrano H., Bertín O., Echeverría I. (1991) Producción de semillas de especies forrajeras. EEA-INTA Pergamino. Boletín de Divulgación Técnica N° 86: 1-48.
- Vencovski R. (1969) Genética cuantitativa. In: Kerr W.E. (Ed.) Mejoramiento e Genética. São Paulo, pp. 17-38.
- Vernengo E., Pantuso F., Piroddi F. (1995) Evaluación de la aptitud forrajera y vigor de plántulas de cinco progenies de *Phalaris aquatica* L. Primeras Jornadas Argentino-Chilenas de Genética y XXVI Congreso Argentino de Genética. San Carlos de Bariloche, Río Negro.
- Vernengo E., Piroddi F. (1999) Instituto Nacional de Semillas (INASE). Catálogo Nacional de Cultivares. Expediente 6137. Catálogo actualizado al 30/05/2014, p. 253. Registro Nacional de Cultivares.
- Vernengo E., Piroddi F., Regueiro A., Spara F., Pantuso F. (2000) Contribución al mejoramiento genético de *Phalaris aquatica* L. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, Concepción. Chile.
- Vernengo E., Wolff R., Spara F. (2003) Mejoramiento genético de *Phalaris aquatica* L. por vigor de plántula y producción de semilla. XXXII Congreso Argentino de Genética, XXXVI Congreso Chileno de Genética y IV Jornadas Argentino-Chilenas de Genética, Huerta Grande, Córdoba.

IS THE GENETIC INTEGRITY OF NATURAL PLANT POPULATIONS *EX SITU* PRESERVED WITH THE CURRENT SAMPLING, CONSERVATION AND REGENERATION APPROACHES?

LA INTEGRIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATURALES DE PLANTAS ¿SE PRESERVA *EX SITU* CON LOS ENFOQUES CORRIENTES DE MUESTREO, CONSERVACIÓN Y REGENERACIÓN?

Camadro, E.L.

E.E.A. Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-FCA, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Ruta Nacional 226, km 73.5, 7620 Balcarce, Buenos Aires, Argentina

camadro.elsa@inta.gob.ar

ABSTRACT

Acceleration of environment degradation and climate change poses serious threats to both natural and agricultural ecosystems. In fact, the number of endangered plant species at the global level has increased yearly in the last decades, due to anthropic interventions that sum up to the climate change. Samples of natural plant populations, particularly of wild crop relatives, are *ex situ* conserved in germplasm banks, which have become active in the provision of genetic resources to breeders. The aim of this article is to generate discussion on the adequacy of (a) current protocols for sampling and *ex situ* conservation of the natural genetic diversity and (b) the actual species paradigm in plants, due to their consequences for this and future generations.

Key words: biological species, *ex situ* conservation, *ex situ* regeneration, plant genetic resources, taxonomic species

RESUMEN

La aceleración de la degradación ambiental y el cambio climático presenta serias amenazas para los ecosistemas naturales y agrícolas. De hecho, el número de especies de plantas en peligro de extinción a nivel global se ha incrementado anualmente en las últimas décadas, debido a intervenciones antrópicas que se suman al cambio climático. Las muestras de poblaciones naturales de plantas, particularmente de parientes silvestres de los cultivos, se conservan *ex situ* en bancos de germoplasma, los que se han transformado en activos en la provisión de recursos genéticos a los mejoradores. El objetivo de este artículo es generar discusión sobre la adecuación de (a) protocolos corrientes de muestreo y conservación *ex situ* de la diversidad genética natural y (b) el paradigma actual de especie en plantas, por sus consecuencias para esta y futuras generaciones.

Palabras clave: especie biológica, conservación *ex situ*, regeneración *ex situ*, recursos genéticos vegetales, especie taxonómica

Fecha de recepción: 22/05/2013
Fecha de aceptación de versión final: 02/06/2014

INTRODUCTION

The situation

In the last decades, the acceleration of environmental degradation processes and climate changes has posed serious threats to the stability of both natural and agricultural ecosystems, highlighting their vulnerability in a scenario of increasing global food demands by an ever-growing human population (Miller et al., 2010). The number of endangered plant species is raising annually due to anthropic interventions (road constructions, deforestation and expansion of the agricultural frontiers, among others) which add up to global climate changes (Jarvis et al., 2008). The narrow genetic base of some of the most important crop plants constrains the breeding efforts. But, fortunately, crop wild relatives (CWR) represent a relevant source of genetic diversity for crop improvement (Maxted et al., 2008). As Jansky et al. (2013) have stated, the value of CWR –historically unappreciated by both agricultural scientists and conservation scientists– is now becoming more apparent to policy makers (see, as examples, <https://unfccc.int/meetings/copenhagen...2009/meeting/6295.php>; www.croptrust.org/; Hoffman et al., 2014). Consequently, it has become necessary to develop strategies for sampling natural populations in a way such as to preserve their genetic integrity in accessions of germplasm banks, for both germplasm enhancement of crop plants and conservation of biodiversity for other human uses (e.g. economic, spiritual, cultural, aesthetic).

Germplasm banks

In a historical perspective, most plant germplasm banks were created in the 20th century for conserving biological samples of the natural diversity. By the mid of that century, and due to the narrow genetic base of the most important world crop which, as previously said, slowed the genetic progress in breeding, CWR became an important source of desirable genes for breeding and other applied purposes. Thus, in addition to the original objective, germplasm banks became active in the provision of reproductive propagules (mainly as botanical seeds) to researchers.

Sampling and ex situ conservation/regeneration protocols

Although the conservation focus was, then, changed from the “biological” to the “genetic” resource (that is, from conserving plants or their propagules to conserving genes), many accessions are the result of the application

of protocols (if any, particularly for the oldest ones) that were developed without taking into account the genetic structure of the sampled populations. In various current protocols aimed at preserving the “genetic integrity” of natural populations, the mode of plant reproduction (either asexual or sexual, by allogamy or autogamy) is mainly considered (e.g. Marshall and Brown, 1975), although other factors such as propagule dispersion strategies, heterogeneity of macro and microenvironments, phenotypic plasticity, among others, should also be taken into consideration (Jain, 1975). Moreover, accessions are usually incorporated into germplasm banks with specific status, assigned on the basis of morphological phenotypes in comparison to holotypes using the Taxonomic Species Concept (TSC). The TSC was developed in the 18th century, well before the publication of Darwin’s Theory of Evolution (1859), Mendel’s laws of inheritance (1865) and the elucidation of the DNA structure (1953) (Grant, 1970; see Camadro et al., 2012). It presupposes that living organisms are at the end of the speciation process; therefore, it does not take into account the natural phenotypic and genetic variability that can be encountered in natural populations, which results from genetic and environmental causes. In contrast to the classification approach followed in plants, the Biological Species Concept (BSC) – which is based on breeding relations and reproductive isolation– is widely accepted in higher animals (see Mayr, 2000, for a discussion on various species concepts). As Camadro (2012) has discussed, hybrids (F₁ and advanced segregating generations) are usually disregarded in current protocols; in fact “out-of-type” plants are generally not sampled in the field or they are discarded during *ex situ* conservation or regeneration (see FAO 2013). So, in an attempt to conserve a given “species” (supposedly “pure”, as defined by morphological phenotypes) (a) it is not considered that genes, not genotypes, are transmitted from one generation to the next and (b) the effective population size (N_e = number of parents that contribute gametes to the next generation) is reduced in sampling and regeneration, inadvertently generating genetic erosion due to genetic drift.

Available information on germplasm banks holdings

Passport information of accessions usually includes only collection date and locality (particularly for the oldest), and geographic coordinates (see examples in <http://www.grfa.org.uk/search/plants/index.html>, <http://www.grfa.org.uk/search/plants/index.html>, <http://www.grfa.org.uk/search/plants/index.html>).

www.ars-grin.gov/Main/docs.htm, <http://www.ars-grin.gov/npgs/holdings.html>). However, and for most accessions, there is no (or there is scarce) information on reproductive behavior of the sampled populations, plant spatial distribution at the sampled sites, number of sampled plants and of reproductive organs sampled/plant, and how accessions were composed. For *ex situ* regeneration, there is no information on N_e , number of harvested reproductive organs/plant and of harvested seeds/fruit, and how the regenerated accessions were composed. Thus, in my opinion, it is not possible to ascertain if germplasm bank accessions conserve the allele frequencies of populations at the sampled sites and –assuming good practices in the handling process– if genetic drift has been avoided.

Gap Analysis

In the last years, Gap Analysis is being carried out to gather and analyze data on the distributions of CWR, to develop a list of taxa in critical need of future collection for conservation (see, as example, <http://dapa.ciat.cgiar.org/cwr-gap-analysis-presented-at-conference/>). The results of this type of analysis can be misleading when the TSC is used in classification and reclassifications of plant groups. In fact, when reclassifications are carried out, two or more different taxonomic species could be considered to be synonymous. As such, fewer areas would be required for conservation of the “species”; furthermore, other prioritized “species”, if they are now considered synonym of a species with good conservation status, will not be sampled (Cadima et al., 2014). If breeding relations were taken into consideration, synonymous “species” could actually be assigned to either the same pool or to different gene pools. If they actually belong to different gene pools, genetic erosion would occur if the various gene pools are not sampled. In fact, if only one part of the natural genetic variability is conserved, it cannot be discarded that the rest could be lost for ever, particularly with the acceleration of the global climate change.

CONCLUSION

The formidable contribution of naturalists, biologists and botanists to the description of plant biodiversity and the conservation efforts carried out over the centuries until the present should be greatly acknowledged. Many successful crop varieties actually carry desirable genes

transferred from wild species into the cultivated gene pool by conventional breeding techniques, and these valuable genetic resources were provided by germplasm banks (see Jansky et al., 2013). Notwithstanding, I consider that the time has come to thoroughly discuss, on objective academic grounds, the current plant species paradigm and *ex situ* conservation and regeneration strategies in the context of population genetic theory, to try to either prevent or minimize genetic erosion and to provide heritable diversity for applied purposes. Understanding natural morphological and molecular diversity of wild populations requires knowledge (and thorough comprehension) of their reproductive biology. Moreover, choice of plant materials and classification approaches have direct consequences on *ex situ* conservation of allelic frequencies of natural populations (Camadro et al., 2012; Camadro, 2012), a legacy that we ought to leave to future generations.

BIBLIOGRAPHY

- Cadima X., van Zonneveld M., Scheldeman X. et al. (2014) Endemic wild potato (*Solanum* spp.) biodiversity status in Bolivia: Reasons for conservation concerns. *J. Nature Conserv.* 22: 113–131.
- Camadro E.L. (2012) Relevance of the genetic structure of natural populations, sampling and classification approaches for conservation and use of wild crop relatives: potatoes as an example. *Botany* 90: 1065–1072.
- Camadro E.L., Erazzú L.E., Maune J.F., Bedogni M.C. (2012) A genetic approach to the species problem in wild potatoes. *Plant Biology* 14 (2012) 543–554
- FAO (2013) Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Grant, V. (1981) *Plant speciation*, 2nd Edn. Columbia University Press, New York.
- Hoffmann, A.; Penner, J.; Vohland, K. et al. (2014) Improved access to integrated biodiversity data for science, practice,

and policy. The European Biodiversity Observation Network (EU BON). *Nature Conservation* 6: 49–65.

Jain S.K. (1975) Population structure and the effects of breeding system. In: *Crop genetic resources for today and tomorrow*, cap. 4. Frankel O.H. and Hawkes J.G. (eds.). Cambridge University Press: Cambridge, London, New York, Melbourne

Jansky S.H., Dempewolf H., Camadro E.L. et al. (2013) A Case for Crop Wild Relative Preservation and Utilization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Crop Science* 53: 746–754.

Jarvis, A., Lane A., Hijmans R.J. (2008) The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 126: 13–23.

Marshall D.R., Brown H.D. (1975) Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: *Crop genetic resources for today and tomorrow*, cap. 4. Frankel O.H. and Hawkes J.G. (eds.). Cambridge University Press: Cambridge, London, New York, Melbourne

Maxted, N., Kell S., Ford-Lloyd B., Dulloo E., Toledo Á. (2012) Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity. *Crop Science* 52: 774–785.

Mayr E. (2006) ¿Por qué es única la biología? Consideraciones sobre la autonomía de una disciplina científica, Katz, Buenos Aires.

Miller, J.K., Herman E.M., Jahn M., Bradford K.J. (2010) Strategic research, education and policy goals for seed science and crop improvement. *Plant Science* 179: 645–652