

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

**TOLERANCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES  
DE AHAS EN GIRASOL SILVESTRE,  
*Helianthus annuus ssp. annuus***

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN AGRONOMIA**

**Ing. Agr. Mg. Alejandro Presotto**

**Directora: Dra. Mónica Poverene**

**2011**

## **PREFACIO**

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en las cátedras de Genética y Producción Vegetal Extensiva, dependiente del Departamento de Agronomía, durante el periodo comprendido entre Abril de 2006 y la fecha actual, bajo la dirección de la Dra. Mónica Poverene, Profesora Titular de Genética.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mis agradecimientos a quienes colaboraron en la elaboración de esta tesis y permitieron que esta se lleve a cabo:

A la Dra. Mónica Poverene, mi directora de tesis, quien estuvo siempre presente durante todos estos años brindando su ayuda y sabios consejos no solo en lo académico sino también en lo personal.

Al Dr. Miguel Cantamutto (Bochi) quien si bien no tuvo un rol formal en esta tesis, participó activamente en el desarrollo y armado de la misma, aportando ideas y ayuda desinteresada de manera incondicional.

A mis amigas y compañeras de trabajo, Soledad Ureta, Julieta Miranda-Zanetti, Agustina Gutiérrez quienes además de brindarme ayuda cuando la necesité, hicieron que el trabajo en el laboratorio, campo, o invernáculo, fuera más ameno.

A la Dra. Alicia Carrera quien me ayudo con sus consejos y experiencia en el laboratorio y estuvo siempre disponible ante cualquiera de mis consultas.

A mis compañeros del laboratorio en CERZOS, especialmente a mis amigos Mauro Meier y Diego Zappacosta, quienes me ayudaron en el inicio de mis tareas en la laboratorio y ante cualquier consulta.

A la Dra. Gabriela Balogh que me dio unos consejos sumamente útiles que ayudaron a terminar con mis tareas en el laboratorio.

A mis amigos, que participaron en algún momento durante estos años en tareas de campo, invernáculo, laboratorio: Carlos Mendiberri, Pablo Errazu, Mauricio Casquero, Matías Fraysse, Walter Bobadilla, Luciano Zubiaga, Ivana Fernandez-Moroni.

A la Ing. Noemi Fritz y al personal de la Cámara Arbitral de Bahía Blanca quienes realizaron los análisis de materia grasa y ácidos grasos del material que nosotros enviamos.

Al Ing. Daniel Alvarez por los aportes que siempre ha realizado cuando viene a visitar el campo experimental y por habernos facilitado semillas de las líneas endocriadas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca de posgrado que posibilito la realización de esta tesis.

...A mi pequeña pero gran familia: Daniel (papá), Silvia (mamá) y Silvina (hermanita)

## RESUMEN

*Helianthus annuus* silvestre es considerada una maleza que puede causar pérdidas importantes sobre los cultivos así como también una fuente de variabilidad para el mejoramiento de girasol. El hallazgo de plantas tolerantes a imidazolinonas en una población de girasol silvestre en un cultivo de soja en EEUU posibilitó el desarrollo de los girasoles Clearfield (CL) que comenzaron a comercializarse en Argentina en 2003. En la región central de nuestro país se han naturalizado poblaciones de *H. annuus* y *H. petiolaris* que coinciden en superficie, período de floración y que hibridan con el girasol doméstico. La posibilidad de transferencia de la tolerancia a imidazolinonas desde los girasoles CL afectaría la dinámica de las poblaciones silvestres, incluyendo su grado de dormición y la tolerancia a herbicidas. No existe información sobre el efecto de la interferencia de *H. annuus* silvestre sobre el rendimiento y la calidad del cultivo de girasol. Tampoco se conoce el efecto sobre el agroecosistema de la presencia de plantas originadas por el flujo de polen desde el girasol silvestre hacia líneas endocriadas en lotes de producción de semilla híbrida de girasol.

Los objetivos generales de esta tesis fueron: 1) caracterizar la dormición de semilla de las poblaciones silvestres y el efecto del cruzamiento con un híbrido CL, 2) estudiar la tolerancia a imazapir en híbridos entre girasol silvestre y doméstico, 3) identificar la resistencia al herbicida mediante marcadores moleculares, 4) cuantificar la disminución del rendimiento y calidad del girasol por efecto de la interferencia del girasol silvestre y 5) estimar el riesgo de aparición de poblaciones invasoras a partir de plantas fuera de tipo originadas por contaminación durante la producción de semilla híbrida de girasol.

Se encontró que las semillas de *H. annuus* silvestre de Argentina responden a estímulo lumínico. Tanto el girasol silvestre como los híbridos silvestre x cultivado germinaron bien a 15°C. El almacenamiento en seco a 5°C aumentó la germinación del girasol silvestre y su progenie silvestre-cultivado. La escarificación mecánica fue el método de acondicionamiento con mayor efecto sobre la ruptura de la dormición de las semillas, aunque el cruzamiento con el girasol CL aumentó levemente la germinación de las semillas. La dormición en el girasol silvestre estaría gobernada por el balance de los ácidos giberélico y abscísico en el embrión y por la composición de las coberturas maternas.

El cruzamiento con el girasol CL aumentó 64 veces la tolerancia a imazapir del girasol silvestre aunque fue menor a la del híbrido de girasol CL. La materia seca radical fue la más afectada por la aplicación de imazapir. El girasol silvestre fue sensible a las sulfonilureas e imidazolinonas evaluadas, si bien el cruzamiento con el girasol CL aumentó la tolerancia a imazapir e imazetapir. El girasol CL fue tolerante a imazapir, imazetapir y ligeramente tolerante a clorimuron. Estos resultados mostraron que la tolerancia al herbicida de la progenie silvestre-cultivado haría práctica y económicamente inviable la utilización de la tecnología CL en girasol.

Un marcador microsatélite ligado a AHAS1 permitió identificar polimorfismos entre el híbrido CL y las líneas endocriadas susceptibles. Las progenies silvestre-cultivado fueron heterocigotas tolerantes. Las poblaciones silvestres presentaron el alelo de la tolerancia en baja frecuencia. La identificación de un nuevo alelo y una elevada proporción de genotipos tolerantes en dos poblaciones de *H. annuus* que conviven con *H. petiolaris* permitieron inferir introgresión de esta última. El marcador sirvió para identificar los genotipos tolerantes y susceptibles en los materiales domesticados y en tres poblaciones silvestres. Sin embargo, su utilidad estaría restringida a poblaciones de girasol sin contacto con *H. petiolaris*. La mutación natural que confiere tolerancia a imidazolinonas se encontró en baja frecuencia en las poblaciones de Argentina pero podría aumentar por hibridación con materiales tolerantes o por selección por el uso del herbicida.

El aumento de la densidad del girasol silvestre invasor disminuyó el rendimiento del cultivo de girasol. Más de 3 plantas m<sup>-2</sup> disminuyeron el rendimiento del cultivo en un 49%. Si bien la cosecha de cipselas de la maleza compensó ligeramente esa merma en el rendimiento, su presencia disminuyó el contenido de aceite y la composición de ácidos grasos del cultivo. Las semillas no recolectadas se incorporaron al banco del suelo. En el peor escenario, aunque las plantas nacidas fueran eliminadas antes que fructifiquen, las semillas podrían permanecer en el lote por 10 años.

Las plantas fuera de tipo originadas por contaminación por polen silvestre durante la producción de semilla híbrida fueron fenotípicamente diferentes a los materiales cultivados y a las poblaciones silvestres. Las plantas descendientes de la siguiente

generación no recobraron el fenotipo silvestre y se asemejaron a los materiales cultivados. En consecuencia, las plantas F1 no podrían originar poblaciones ferales de girasol, aunque podrían actuar como puente biológico y transferir caracteres, como la tolerancia a imidazolinonas, a las poblaciones silvestres.

## SUMMARY

Wild *Helianthus annuus* is considered a weed that causes significant crop losses and also is considered as a source of variability for sunflower breeding. The finding of imidazolinone-tolerant wild sunflower plants in a soybean crop in the US enabled the development of Clearfield (CL) sunflowers, commercially produced in Argentina since 2003. Populations of *H. annuus* and *H. petiolaris* have naturalized in the central region of our country, sharing growing areas, flowering time, and both hybridize with the domestic sunflower. The possibility of transference of imidazolinone tolerance from sunflower CL varieties to wild sunflower would affect the wild population dynamics, including dormancy and herbicide tolerance. There is no information on wild *H. annuus* interference on sunflower yield and quality. Also the effect of off-type plants produced by pollen flow from the wild sunflower to sunflower inbred lines during seed production is unknown.

The main objectives of this thesis were: 1) to characterize seed dormancy in wild populations and the effect of mating with a sunflower CL cultivar, 2) to study imazapyr tolerance in hybrids between wild and domestic sunflower, 3) to identify herbicide tolerance using molecular markers, 4) to quantify sunflower crop yield and quality reduction caused by wild sunflower interference, and 5) to estimate the risk of invasive populations originated in off-type pollen contamination during sunflower seed production.

It was found that wild *H. annuus* seeds respond to light stimulus. Wild sunflowers and their wild-crop progenies germinated well at 15°C. Dry storage at 5°C increased both biotype germination. Mechanical scarification was the preparation method with greater breaking effect on seeds dormancy, although crossing with a sunflower CL cultivar slightly increased seed germination. Dormancy in wild sunflower would be governed by the balance between gibberellic and abscisic acids in the embryo, and the composition of maternal coat.

Hybridization with a CL sunflower cultivar increased the wild sunflower tolerance to imazapyr 64 times, though it remained lower than the CL cultivar. Root dry matter was

most affected by imazapyr. Wild sunflower was sensitive to all evaluated sulfonylureas and imidazolinones, although hybridization with CL sunflower increased imazapyr and imazethapyr tolerance. The CL sunflower cultivar was tolerant to imazapyr, imazethapyr and slightly tolerant to chlorimuron. These results showed that IMI-tolerance of sunflower wild-crop progeny would render unfeasible the usage of CL technology in sunflower crop, from a practical and economic standpoint.

A SSR marker linked to AHAS1 allowed polymorphism identification among the CL cultivar and susceptible inbred lines. The wild-crop progeny were tolerant heterozygotes. Wild populations had the "tolerant" allele at low frequencies. Identification of a new allele and a high proportion of resistant genotypes in two populations of *H. annuus* that grew close to *H. petiolaris* allowed to infer introgression from the later. The SSR marker was useful to identify tolerant and susceptible genotypes in domesticated materials and three wild populations. However, its utility would be restricted to wild sunflower populations without contact with *H. petiolaris*. The natural mutation conferring imidazolinone tolerance was found in a low frequency in wild populations but may increase by hybridization with tolerant materials or selection by herbicide usage.

Increasing densities of invasive wild sunflower decreased sunflower crop yield. More than 3 plants m<sup>-2</sup> reduced crop yield by 49%. While weed achene harvest slightly counteracted this decline, their presence reduced crop oil content and altered fatty acid composition. Spilled seeds were incorporated to the soil bank. In the worst scenario if plants were removed before shattering, seeds could remain in soil for 10 years.

Off-type plants originated by wild pollen contamination during seed production were phenotypically different from cultivated materials and wild populations. Plants from the next generation did not recover the wild phenotype and resembled the cultivated materials. Therefore F1 plants would not originate feral sunflower populations but could act as a bridge to transfer biological traits, such as imidazolinone tolerance, to wild populations.

## INDICE

<b>PREFACIO</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCION GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo 1: IMPACTO DE LA HIBRIDACION CON GIRASOL TOLERANTE A IMIDAZOLINONAS SOBRE LA DORMICION DE SEMILLA EN POBLACIONES DE <i>Helianthus annuus</i> L.</b> .....	<b>9</b>
MATERIALES Y METODOS .....	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN .....	42
<b>Capítulo 2: SENSIBILIDAD A SULFONILUREAS E IMIDAZOLINONAS DE POBLACIONES DE <i>Helianthus annuus</i> Y SUS HIBRIDOS CON UN GIRASOL CL</b> .....	<b>47</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
RESULTADOS.....	55
DISCUSIÓN .....	70
<b>Capítulo 3: CARACTERIZACION MOLECULAR DE POBLACIONES SILVESTRES DE <i>Helianthus annuus</i> Y SUS F1 CON UN CULTIVAR TOLERANTE A IMIDAZOLINONAS</b> .....	<b>75</b>
MATERIALES Y METODOS .....	77
RESULTADOS.....	80
DISCUSIÓN .....	87
<b>Capítulo 4: CARACTERIZACION DE LA INTERFERENCIA DE MALEZAS DEL GENERO <i>Helianthus</i> EN UN LOTE DE GIRASOL</b> .....	<b>90</b>
MATERIALES Y METODOS .....	93
RESULTADOS.....	94
DISCUSIÓN .....	100
<b>Capítulo 5: HÍBRIDOS DE GIRASOL CULTIVADO-SILVESTRE: IDENTIFICACION Y RIESGOS</b> .....	<b>103</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	106

RESULTADOS.....	108
DISCUSIÓN .....	114
<b>CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>PRODUCCION CIENTIFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS .....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura I: Localización de *Helianthus annuus* silvestre y *Helianthus petiolaris* en Argentina. Cada símbolo representa un departamento provincial donde la especie se encuentra presente (Origen: Poverene *et al.*, 2002).....3
- Figura II: Diagrama de dispersión del análisis discriminante de 17 poblaciones norteamericanas y nueve argentinas utilizando variables métricas (LSMEANS) observadas en un jardín común. Las poblaciones argentinas se destacan en **negrita** (Origen: Presotto, 2007).....6
- Figura 1.1: Relación ancho/largo de cipselas de nueve poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* argentinas (ARG), 17 poblaciones norteamericanas (USA) y cinco materiales domesticados (SUN). Los puntos más alejados dentro de los materiales domesticados corresponden a un híbrido confitero (elaboración propia en base a Cantamutto *et al.*, 2008b)..... 11
- Figura 1.2: Efecto de la escarificación de cipselas de *Helianthus annuus*. Cipselas escarificadas (EM), semillas sin escarificar (no)..... 14
- Figura 1.3: Efecto de la escarificación sobre el incremento en peso (%) de semillas de *Helianthus annuus* silvestre durante las primeras 30 horas de imbibición en agua destilada a 20°C y fotoperíodo neutro. EM: escarificación mecánica, no: control..... 18
- Figura 1.4: Efecto del estímulo lumínico sobre la germinación de una población silvestre de *Helianthus annuus* proveniente de Diamante (Entre Ríos) y la descendencia de un híbrido comercial de girasol cultivado inmediatamente luego de la maduración. 19
- Figura 1.5: Germinación acumulada (media  $\pm$  error estándar) de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y su cruce con un cultivar de girasol IMI-tolerante (F1) durante 15 días en un ensayo de gradiente térmico..... 20
- Figura 1.6: Germinación acumulada (media  $\pm$  error estándar) de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y sus progenies (F1) con un híbrido comercial CL bajo seis temperaturas y fotoperíodo neutro. .... 23
- Figura 1.7: Germinación (%) de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y de sus respectivas cruces con un híbrido comercial CL (F1) en función del tiempo de almacenamiento a 5°C y los sistemas de acondicionamiento. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control. .... 26
- Figura 1.8: Germinación (%) de un biotipo (población y F1) de *Helianthus annuus* proveniente de Adolfo Alsina (Buenos Aires) en función del tiempo de estratificación a 5°C y de cuatro tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control..... 29
- Figura 1.9: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Colonia Barón (La Pampa) en función de los tratamientos y generaciones. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control..... 31

Figura 1.10: Germinación (%) de un biotipo de <i>Helianthus annuus</i> proveniente de Diamante (Entre Ríos) en función del tiempo de estratificación a 5°C y las generaciones. SIL: <i>H. annuus</i> silvestre, F1: cruzamiento silvestre-cultivado.....	33
Figura 1.11: Germinación (%) de un biotipo de <i>Helianthus annuus</i> proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función del tiempo de estratificación a 5°C y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.....	35
Figura 1.12: Germinación (%) de un biotipo de <i>Helianthus annuus</i> proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función del tiempo de estratificación a 5°C y las generaciones. SIL: <i>H. annuus</i> silvestre, F1: cruzamiento silvestre-cultivado.....	36
Figura 1.13: Germinación (%) de un biotipo de <i>Helianthus annuus</i> proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función de las generaciones y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.....	37
Figura 1.14: Germinación (%) de un biotipo de <i>Helianthus annuus</i> proveniente de Río Cuarto (Córdoba) en función del tiempo de estratificación a 5°C y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.....	39
Figura 2.1: Curvas de dosis-respuesta simétricas y asimétricas. La figura de la izquierda corresponde a una curva de dosis-respuesta simétrica (ecuación 1 y 2). La figura de la derecha corresponde a una curva de dosis-respuesta asimétrica (ecuación 3 y 4). Origen: Knezevic <i>et al.</i> , (2007).....	50
Figura 2.2: Supervivencia (%) de plantas en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para: <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).....	60
Figura 2.3: Biomasa aérea (mg) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1). .....	62
Figura 2.4: Biomasa radicular (mg) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para dos biotipos, <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).....	64
Figura 2.5: Materia seca (mg) de plantas de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos biotipos (F1) bajo tres dosis y siete herbicidas de las familias de las sulfonilureas e imidazolinonas.....	69
Figura 3.1: ADN genómico de plantas de <i>Helianthus annuus</i> silvestre obtenido con el método CTAB. La banda intensa de alto peso molecular indica que el ADN no se encuentra degradado. ....	79
Figura 3.2: Mortandad de biotipos silvestres de <i>Helianthus annuus</i> (SIL) y sus progenies (F1) con un híbrido CL luego de la aplicación de imazapir (2X) en el estadio de cuatro hojas. Las frecuencias fueron analizadas mediante tablas de contingencia utilizando el Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson como estadístico. ....	81

Figura 3.3: Patrón de amplificación del par de primers p16/17 ligados al locus AHAS1. Calles 3, 7, 8 y 13 corresponde a genotipos homocigotas susceptibles. Calles 1 y 12 corresponde a genotipos homocigotas tolerantes. Calles 2, 4-6 y 9-11 corresponde a genotipos heterocigotas tolerantes. Marcador de peso molecular en calle 14..... 81

Figura 3.4: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para las población de Diamante, DIA (calles 1-11 y 24-35), F1 Diamante-CL retrucruzada con CL (calles 12-21). La calle 22 corresponde a la línea endocriada HA89 y la calle 23 al híbrido DK3880CL. La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (Imr1Imr1), la flecha azul el genotipo homocigota susceptible (imr1imr1) y la flecha amarilla al genotipo heterocigota tolerante (Imr1imr1). ..... 85

Figura 3.5: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para la población de Adolfo Alsina, AAL (calles 3-21 y 27-35), las líneas endocriadas HA369 (calle 1), HAR5 (calle 23), HAR2 (calle 24) y el híbrido DK3880 CL (calles 2 y 26). La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (Imr1Imr1), la flecha azul al genotipo homocigota susceptible (imr1imr1) y la flecha verde el nuevo alelo (A327). Marcador de peso molecular en la calle 22 y blanco en la calle 25. .... 85

Figura 3.6: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para plantas de *Helianthus petiolaris* provenientes de Colonia Barón (BAR, calles 1-6) y Adolfo Alsina (AAL, calles 7-16), población de *Helianthus annuus* de Adolfo Alsina (calles 20-28), el híbrido DK3880 CL (calle 17) y las líneas endocriadas (calles 18-19). La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (Imr1Imr1), la flecha azul al genotipo homocigota susceptible (imr1imr1) y la flecha verde el nuevo alelo A327. .... 86

Figura 4.1: Detalle de una planta feral de *Helianthus annuus* (izquierda) y vista general del lote invadido de girasol (derecha). ..... 96

Figura 4.2: Análisis de componente principales en un lote de girasol invadido (Barrow, Buenos Aires). Los vectores corresponden a las variables más explicativas. .... 97

Figura 4.3: Diámetro del capítulo (a), granos llenos (b), P1000 (c) y rendimiento (d) para tres grupos de stand de plantas ferales de *H. annuus*. ns, \*, \*\*: significación del ANOVA. 0-1: hasta 1 planta de maleza m<sup>-2</sup>, 2-3: hasta 3 plantas de maleza m<sup>-2</sup> y 4+: 4 o más plantas de maleza m<sup>-2</sup>. ..... 98

Figura 4.4: Estimación de la densidad máxima de semillas activas (semillas m<sup>-2</sup>) en el banco del suelo a partir de la dispersión inicial observada en el lote de Barrow y la dormición del primer año. Se consideró que no se produjeron nuevos aportes de semillas, una mortandad inicial del 83% y que la dormición inicial del 47% se mantuvo durante todo el período simulado. Los valores sobre los puntos indican el número de semillas activas m<sup>-2</sup> en cada año. .... 102

Figura 5.1: Análisis de componentes principales de girasol silvestre (SIL) y cultivado (SUN), las líneas endocriadas (HA89, A10 y A09), F1, F2 y retrocruzas (R1 y R2) con plantas silvestres. En el inserto posterior se muestran los rasgos que están más correlacionados con los componentes 1 y 2. .... 111

Figura 5.2: Clasificación de plantas basada en el análisis discriminante de girasol cultivado (SUN), F1, F2 y retrocruzas (BC1 y BC2) entre las líneas puras (LE) y girasol silvestre (SIL). ..... 112

Figura 5.3: Análisis discriminante de descendientes de plantas fuera de tipo (F2), silvestre (SIL), girasol cultivado (SUN) y líneas endocriadas (LE). ..... 113

## LISTA DE TABLAS

Tabla I: Caracteres morfológicos distintivos entre las especies silvestres, <i>Helianthus annuus</i> , <i>H. petiolaris</i> y el girasol domesticado. Origen: Poverene <i>et al.</i> , 2002; Presotto <i>et al.</i> , 2009a; Gutierrez <i>et al.</i> , 2010. ....	4
Tabla 1.1: Germinación diaria en poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> (SIL) y sus respectivas progenies (F1) con un híbrido comercial CL en función del tiempo de almacenamiento (0, 6 y 12 meses) en un ensayo de gradiente térmico bajo seis temperaturas y fotoperíodo neutro, durante un período de 15 días. Bajo cada día se encuentra el ANOVA con sus fuentes de variación e interacciones. TMG: Temperatura diaria con mayor porcentaje de germinación.....	22
Tabla 1.2: Análisis de varianza de la germinación de cinco poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL) y sus respectivas progenies (F1) con un híbrido comercial CL, utilizando tres acondicionamientos y tres períodos de almacenamiento seco a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro. ....	25
Tabla 1.3: Germinación (%) de semillas sin acondicionamiento de cinco poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL) y sus respectivas progenies con un híbrido comercial CL (F1) en función del tiempo de estratificación a 5°C (TE). ....	27
Tabla 1.4: Germinación (%) de semilla recién cosechada de cinco poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL) y sus respectivas progenies con un híbrido comercial CL (F1) en función de los sistemas de acondicionamiento para romper la dormición. .	27
Tabla 1.5: Análisis de varianza de germinación de una población de <i>Helianthus annuus</i> silvestre proveniente de Adolfo Alsina (Buenos Aires) y de su cruce con un cultivar de girasol CL, bajo cuatro acondicionamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro. ....	28
Tabla 1.6: Análisis de varianza de germinación de una muestra de población de <i>Helianthus annuus</i> silvestre proveniente de Colonia Barón (Buenos Aires) y de su cruce con un híbrido comercial de girasol CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro. ....	30
Tabla 1.7: Análisis de varianza de germinación de una población de <i>Helianthus annuus</i> silvestre proveniente de Diamante (Entre Ríos) y de su cruce con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro. ....	32
Tabla 1.8: Análisis de varianza de germinación de una población de <i>Helianthus annuus</i> silvestre proveniente de Las Malvinas (Mendoza) y de su cruce con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro.....	34
Tabla 1.9: Análisis de varianza de germinación de una población de <i>Helianthus annuus</i> silvestre proveniente de Río Cuarto (Córdoba) y de su cruce con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro. ....	38

Tabla 1.10: Germinación de semilla fresca (G0), diferencial por cruzamiento ( $\Delta F1$ ), diferencial por almacenamiento 12 meses a 5°C ( $\Delta TE$ ) y diferenciales por acondicionamientos ( $\Delta EM$ , $\Delta AG_3$ , $\Delta FRIO$ ) en cinco poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> .	40
Tabla 1.11: Tiempo de germinación del 50% de las semillas (TG50) de cinco poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> sin escarificar (SIL), escarificada (EM) o cruzada con un híbrido imi-tolerante (F1).	41
Tabla 1.12: Proporción germinación SIL: F1 bajos dos escenarios extremos. Escenario 1: todas las semillas activas germinan en la primavera luego de estar seis meses invernando (G6). Escenario 2: sólo germina la proporción de semillas que despierta luego del período invernal (G6-G0), las que germinaron luego de la cosecha (G0) son aniquiladas en el invierno.	46
Tabla 2.1: Herbicidas aplicados en poblaciones silvestres de <i>H. annuus</i> , el híbrido comercial DK3880CL y cruzamientos silvestre-cultivado. p.a: principio activo, NC: nombre comercial, 1,0X: dosis recomendada (CASAFE, 2007) y CULTIVOS en los que se utilizan.	54
Tabla 2.2: Análisis de varianza de la biomasa aérea, radicular y relación planta/raíz de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL) y sus cruza con un híbrido CL (F1) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®).	55
Tabla 2.3: Supervivencia, biomasa por planta y de raíz, y relación planta/raíz (media $\pm$ error estándar) en plantas silvestres de <i>Helianthus annuus</i> (SIL) y su cruza con un híbrido comercial CL (F1) bajo cuatro dosis de imazapir.	57
Tabla 2.4: Análisis de varianza de la biomasa aérea, radicular y relación planta/raíz de <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL y las progenies silvestre-cultivado (F1) en función a dosis crecientes de imazapir (Clearsol®).	58
Tabla 2.5: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de supervivencia en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para dos biotipos evaluados: <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).	59
Tabla 2.6: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de la biomasa aérea por planta en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).	61
Tabla 2.7: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de la biomasa radical por planta en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).	63
Tabla 2.8: Relación planta/raíz (media $\pm$ error estándar) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para dos biotipos de girasol, <i>Helianthus annuus</i> silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).	65
Tabla 2.9: Supervivencia (media $\pm$ error estándar) de siete principios activos pertenecientes a las familias de las sulfonilureas e imidazolinonas sobre biotipos	

silvestres de <i>Helianthus annuus</i> (SIL), un híbrido comercial tolerante a imidazolinonas (IMI) y las progenies entre ambos (F1). .....	68
Tabla 2.10: Estudios sobre resistencia cruzada de <i>Helianthus annuus</i> a herbicidas inhibidores de AHAS. R/S: relación entre DL50 del genotipo tolerante y el susceptible. En el caso N° 2 la relación R/S está basada en I50 (inhibición del 50% de la actividad enzimática). .....	74
Tabla 3.1: Secuencias de los primers utilizados para la evaluación de F1, R1, poblaciones silvestres, líneas endocriadas, híbrido comercial y la cruce control (HA89 x DK3880CL®). .....	80
Tabla 3.2: Genotipos identificados con los primers p18/19 (AHAS1) en tres biotipos silvestres de <i>Helianthus annuus</i> y sus respectivas cruces con el híbrido CL (F1). imr1imr1: homocigota susceptible; Imr1imr1: heterocigota tolerante: Imr1Imr1: homocigota tolerante. Los datos fueron analizados mediante tablas de contingencia utilizando el Chi-cuadrado de Pearson. ....	82
Tabla 3.3: Alelos, heterocigosis promedio, frecuencias alélicas y ajuste al modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg en cinco poblaciones silvestres argentinas de <i>Helianthus annuus</i> para el locus AHAS1, amplificado con los primers p18/19. ....	86
Tabla 4.1: Ubicación y características del cultivo y la maleza en lotes de girasol domesticado invadidos por malezas del género <i>Helianthus</i> en la región central de Argentina. ....	92
Tabla 4.2: Rasgos distintivos entre el cultivo de girasol y la maleza del mismo género en Barrow (Buenos Aires). ....	95
Tabla 4.3: Materia grasa (%) y perfil de ácidos grasos del cultivo y la maleza en un lote de girasol ubicado en cercanías a la localidad de Barrow (Buenos Aires). ....	99
Tabla 4.4: Relación cultivo:maleza cosechado (C:M), rendimiento cosechado (RC), materia grasa (MG), ácidos grasos linoleico y oleico en un lote de girasol cultivado (Barrow, Buenos Aires) en función de densidades crecientes de plantas ferales de <i>Helianthus annuus</i> . ....	99
Tabla 5.1: Características morfológicas de líneas endocriadas (LE), girasol silvestre (SIL), su progenie (F1) y el girasol cultivado (SUN). Rasgos en negrita diferencian a las plantas F1 de LE y SUN. ....	110

## ABREVIATURAS

A260: absorbancia a 260 nm  
A280: absorbancia a 280 nm  
A377: alelo con un peso molecular de 327 pb  
AAL: Adolfo Alsina  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AG<sub>3</sub>: ácido giberélico  
AHAS: Acetohidroxiácido sintasa  
ALA: alanina  
ALS: Acetolactato sintetasa  
ANN: *Helianthus annuus*  
ANOVA: análisis de varianza  
ARG: Argentina  
ARI: Arizona  
ARN: ácido ribonucleico  
BAR: Colonia Barón  
BC1: primera retrocruza  
BC2 : segunda retrocruza  
BCBB: Bolsa de Cereales de Buenos Aires  
CAL: California  
CHU: Carhué  
CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo  
CL: Clearfield®  
cm: centímetros  
CM: cuadrados medios  
COL: Colorado  
CP: componente principal  
CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide  
DIA: Diamante  
DL50: dosis que controla al 50% de los individuos  
dNTP: desoxirribonucleótidos trifostato  
DS: desvío estandar  
ED50: dosis que reduce el 50% de la biomasa  
EEA: estación experimental agropecuaria  
EEUU: Estados Unidos  
EM: escarificación mecánica  
F: cociente entre el cuadrados medios  
F1: híbrido de primera generación  
F2: descendientes de F1  
FV: fuente de variación  
g: gramos  
G0: germinación de semillas frescas o luego de la cosecha  
G1: GAP1 (intervalo 1 de la división celular)  
G2: GAP2 (intervalo 2 de la división celular)  
G6: germinación luego de 6 meses de estratificación a 5°C  
h: hora/s

ILL: Illinois  
IMI: imidazolinonas  
INASE: Instituto Nacional de Semillas  
IND: Indiana  
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
IOW: Iowa  
ISTA: International Seed Testing Association  
JCE: Juárez Celman  
Kg: kilogramos  
KS: Kansas  
LE: líneas endocriadas  
LMA: Las Malvinas  
LSMEANS: least squares means  
m: metros  
m<sup>2</sup>: metros cuadrados  
MAG: Media Agua  
MON: Montana  
msnm: metros sobre el nivel del mar  
nc: no corresponde  
NDK: North Dakota  
NEV: Nevada  
NKA: Nebraska  
NMX: New México  
ns: no significativo  
OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development  
OKL: Oklahoma  
p: área bajo la curva normal  
pb: pares de bases  
PCR: polymerase chain reaction  
PET: *Helianthus petiolaris*  
PTB: pirimidiltiobenzoatos  
QTL: quantitative traits loci  
r: coeficiente de correlación  
R2: botón floral a menos de 2 cm de la última hoja  
R3: botón floral a más de 2 cm de la última hoja  
R4: flores liguladas visibles  
R5: floración  
R6: fin de floración  
R7: envés del capítulo amarillo pálido  
R8: envés del capítulo amarillo  
R9: madurez fisiológica  
RAN: Rancul  
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA  
RCU: Río Cuarto  
RR: Roundup Ready  
SCT: sulfonil amino carbonil triazolinonas  
SDK: South Dakota  
SIL: *Helianthus annuus* silvestre

SSR: simple sequence repeats  
SU: sulfonilureas  
SUN: girasol domesticado  
TA: temperatura de 'annealing'  
TE: tiempo de estratificación a 5°C  
TG50: tiempo de germinación del 50% de las semillas  
TMG: temperatura de máxima germinación  
TP: triazolpirimidinas  
TX: Texas  
UNE: unificación de normativas españolas  
UNS: Universidad Nacional del Sur  
USA: United States of America  
USDA: United States Department of Agriculture  
UTH: Utah  
VBRC: Valle Bonaerense del Río Colorado  
WYO: Wyoming

## **INTRODUCCION GENERAL**

El girasol se destaca por su producción de aceite como uno de los principales cultivos oleaginosos en el mundo, superando los 12 millones de toneladas, que lo posiciona en el cuarto lugar luego de los aceites de palma, soja y colza. Entre las regiones más importantes, la Unión Europea, Rusia, Ucrania y Argentina conjuntamente superan el 70% de la producción mundial de esta oleaginosa (USDA, 2010).

El girasol en Argentina es actualmente la segunda oleaginosa más importante luego de la soja, con una producción que en los últimos 10 años ha superado los tres millones de toneladas, excepto en la pasada zafra en la cual las condiciones económicas y una fuerte sequía condicionaron la siembra. Las regiones que más participan en la producción de girasol son el sudeste y oeste de Buenos Aires, norte y oeste de La Pampa, la cuenca del Río Salado y el centro-norte de Santa Fe (BCBB, 2010).

Argentina se ha caracterizado por su tradición en la producción de girasol. Sus orígenes en nuestro país se remontan al siglo XIX cuando fue introducido por inmigrantes de origen hebreo. En principio se lo sembraba para consumo familiar. A esta etapa le siguió un período de gran expansión, a partir de 1930, que se caracterizó por la utilización de poblaciones de gran porte y carentes de uniformidad. Entre 1960 y 1975, el INTA liberó variedades propias, como Manfredi e Impira INTA, que se caracterizaron por su buen comportamiento frente a la roya negra, enfermedad que había causado fuertes mermas hacia fines de la década de 1950. Estas variedades surgieron de cruzamientos entre los materiales utilizados por los agricultores, algunas introducciones y polen de una población de girasol silvestre hallada en Río Cuarto (Baez y Mácola, 1954; Bertero y Vazquez, 2003). El descubrimiento de la androesterilidad citoplasmática en 1968 dio lugar a la etapa de la difusión de los cultivares híbridos, que llevaron a una continua evolución del cultivo. A fines de la década de 1990 el panorama nacional e internacional cambió principalmente por la demanda de proteínas vegetales suplidas por la soja, la competitividad de la soja RR y el crecimiento en la producción de aceite de palma, lo que disminuyó la siembra y comenzó a relegar al cultivo de girasol a regiones con menor potencial productivo (Ingaramo y Feoli, 2008).

El girasol pertenece a la familia Asteraceae, subfamilia Asteroideas, tribu Heliánteas, género *Helianthus*. El género es nativo de América del Norte y consta de 14 especies anuales y 37 perennes. A su vez, puede ser dividido en cinco secciones: Agrestes, Atrorubens, Ciliares, *Helianthus* y Porteri. La sección *Helianthus* incluye 12 especies anuales bien diferenciadas, aunque la hibridación natural es frecuente. Dentro de este grupo se encuentra el girasol cultivado (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus*) domesticado a partir de *Helianthus annuus* L., y otras especies silvestres como *Helianthus argophyllus* T. y G. y *Helianthus petiolaris* Nutt. (Schilling y Heiser, 1981; Seiler y Rieseberg 1997; Jan y Seiler, 2007).

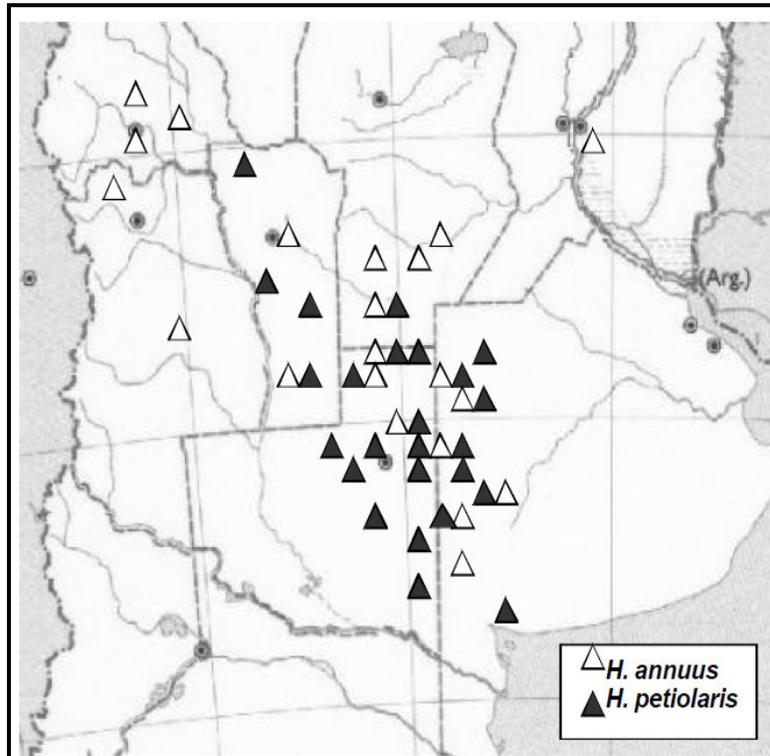
Evidencias arqueológicas avalan la hipótesis de que el girasol fue domesticado por los nativos americanos en la región central de América del Norte, actualmente los estados del centro de EEUU, quienes utilizaban el girasol silvestre como fuente de alimento. Fue introducido en Europa en el siglo XVI como una planta ornamental. En el siglo XVIII en Rusia es reconocido su potencial como cultivo oleaginoso y en 1860 comienza una intensa labor de selección por alto contenido de aceite (Seiler y Rieseberg, 1997; Harter *et al.*, 2004; Jan y Seiler, 2007).

Una forma silvestre de esta especie, clasificada como *H. annuus* ssp. *annuus*, se ha naturalizado en Argentina. Conjuntamente con *H. petiolaris* se encuentra distribuida en la región central de nuestro país, compartiendo una amplia superficie con el girasol cultivado (Poverene *et al.*, 2002). La superposición de áreas geográficas, la coincidencia de la floración y los polinizadores compartidos facilitan el flujo génico entre las formas silvestre y domesticada tanto en el centro de origen como en nuestro país (Arias y Rieseberg 1995; Burke *et al.*, 2002; Massinga *et al.*, 2003; Ureta *et al.*, 2008).

Las poblaciones de *H. annuus* y *H. petiolaris* naturalizadas en la región central de Argentina se habrían expandido colonizando ambientes similares, mediante dispersión mecánica causada por vehículos y maquinaria (Cantamutto *et al.*, 2010a). La maquinaria agrícola contratada, que a partir de la década de 1990 se encuentra en pleno auge y que es utilizada por el 47% de los establecimientos de la región pampeana (Piñeiro y Villarreal, 2005), podría ser un importante elemento en la dispersión del girasol silvestre.

Las poblaciones argentinas de *H. annuus* se distribuyen entre 31°58' a 37°31' latitud sur y 60°33' a 68°14' longitud oeste, a una altitud de 128 a 600 msnm. Las plantas crecen en áreas perturbadas como banquinas, caminos vecinales, lotes sin cultivar, márgenes de canales de riego, agrupadas en poblaciones que pueden tener desde pocos individuos a más de 100.000 plantas. Por otro lado, *H. petiolaris* se distribuye en un rango más estrecho, entre 35°08' a 38°08' latitud sur y 62°16' a 65°56' longitud oeste y hasta una altitud de 455 msnm. Las poblaciones son muy numerosas en el este de La Pampa y el oeste de Buenos Aires con densidades de hasta 40 plantas m<sup>-2</sup> (Figura I; Poverene *et al.*, 2008).

Figura I: Localización de *Helianthus annuus* silvestre y *H. petiolaris* en Argentina. Cada símbolo representa un departamento provincial donde la especie se encuentra presente (Origen: Poverene *et al.*, 2002).



En cuanto a los ambientes, *H. annuus* silvestre se encuentra en suelos de mayor fertilidad y textura más fina, con mayores niveles de fósforo y materia orgánica disponible y donde la principal fuerza erosiva es el agua. *H. petiolaris* se halla en suelos arenosos con menos de 2% de materia orgánica y en ambientes donde el viento es la

principal fuerza erosiva. Molisoles y Entisoles son los principales órdenes de suelo asociados a ambas especies (Cantamutto *et al.*, 2008a).

Ambas especies silvestres se distinguen fácilmente del girasol domesticado. Poseen plantas ramificadas desde la base con una gran cantidad de capítulos que puede superar el centenar. Las plantas de *H. petiolaris* tienen menor porte con hojas de aproximadamente 8 cm de largo y 5 cm de ancho, poseen capítulos unos 2,5 cm de diámetro con pubescencia blanca característica en el centro del disco. Los lóbulos de la corola de las flores son de color púrpura, aunque raras veces aparecen corolas amarillas. Las plantas de *H. annuus* silvestre son más altas, pudiendo superar los 3 m de altura con hojas de 25 cm de largo y 22 cm de ancho, poseen capítulos de unos 4,5 cm de diámetro con las corolas de las flores tubulares generalmente de color rojo (Tabla I; Poverene *et al.*, 2002; Presotto *et al.*, 2009a; Gutierrez *et al.*, 2010).

Tabla I: Caracteres morfológicos distintivos entre las especies silvestres, *Helianthus annuus*, *H. petiolaris* y el girasol domesticado. Origen: Poverene *et al.*, 2002; Presotto *et al.*, 2009a; Gutierrez *et al.*, 2010.

Caracteres	<i>H. annuus</i>	<i>H. petiolaris</i>	Girasol domesticado
Altura (m)	≤ 3,0 m	≤ 2,0 m	≤ 2,0 m
Ramificación	total	total	sin
Antocianina en tallo	generalmente presente	presente	ausente
Largo de la hoja (cm)	≤ 35 cm	≤ 9 cm	≤ 35 cm
ancho de la hoja (cm)	≤ 30 cm	≤ 6 cm	≤ 30 cm
Capítulos (n°)	> 30	> 30	1
Capítulos (cm)	≤ 6 cm	≤ 3 cm	> 8 cm
Coloración de las flores tubulares	generalmente rojas	rojas, rara vez amarillas	amarillas
Pelos blancos en el centro del capítulo	ausente	presente	ausente
Largo de la cipsela (mm)	≤ 7 mm	≤ 5 mm	>10

El Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC) situado en el sur de la provincia de Buenos Aires tiene una participación muy importante en la producción de semilla de girasol. Según información del Instituto Nacional de Semillas (INASE, 2007) allí se cultiva más del 85% de los lotes destinados a ese fin, con la presencia de la mayor parte de las empresas del sector. La población estable de *H. annuus* silvestre más cercana se encuentra a menos de 300 km de distancia (Poverene *et al.*, 2002). La similitud macro y micro-ambiental del VBRC con respecto a los ambientes donde crecen *H. annuus* y *H. petiolaris* lo hacen vulnerable a la invasión por estas especies (Cantamutto *et al.*, 2007).

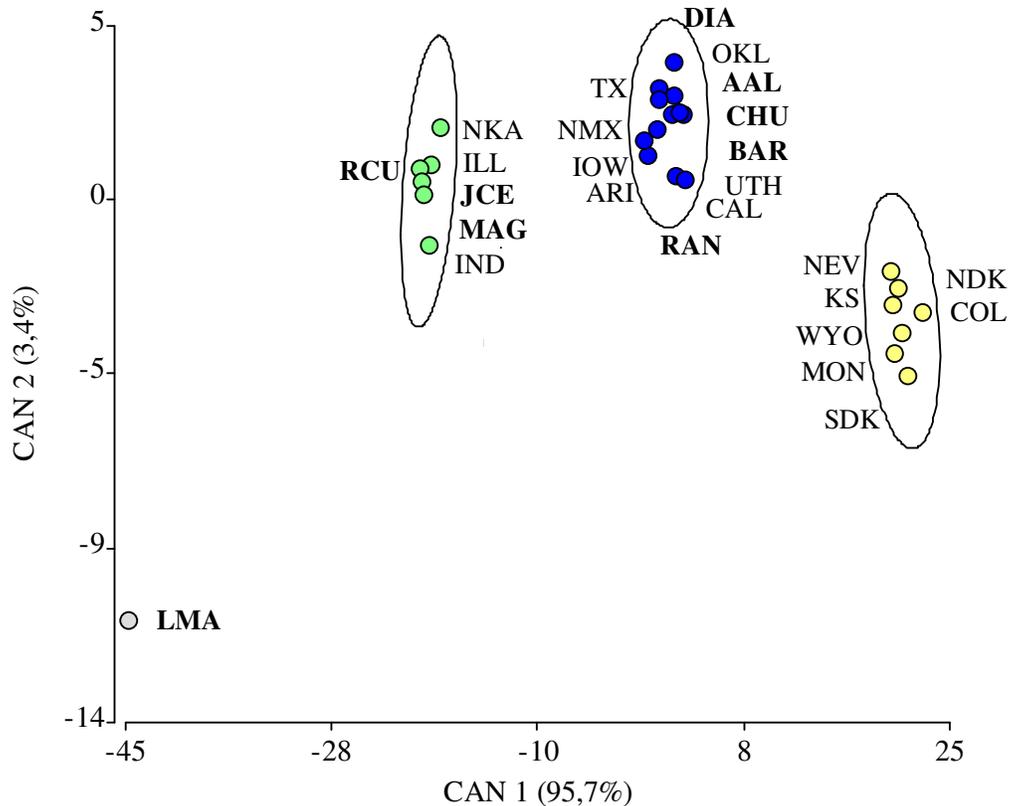
La contaminación de semilla comercial por polen de girasol silvestre podría poner en riesgo la viabilidad del VBRC como región productora de semilla híbrida de girasol.

Un estudio en jardín común reveló que poblaciones silvestres argentinas de *H. annuus* fueron similares a 17 poblaciones silvestres provenientes del centro de origen. Las poblaciones argentinas presentaron mayores similitudes fenotípicas con las del centro-oeste de EEUU. Una fracción del germoplasma del norte de ese país mostró una combinación de caracteres morfológicos que no estuvieron presentes en las poblaciones argentinas analizadas. Por otro lado, una de las poblaciones silvestres argentinas con evidencias fenotípicas de introgresión con girasol cultivado se separó de los restantes biotipos silvestres (Figura II; Presotto, 2007).

*Helianthus annuus* silvestre es una importante maleza en América del Norte. En cultivos de soja se observó que 4,6 plantas m<sup>-2</sup> de girasol silvestre disminuyeron el rendimiento un 95% (Geier *et al.*, 1996). También ha causado pérdidas del 27% en trigo pan con una densidad de 2 plantas m<sup>-2</sup> (Rosales-Robles *et al.*, 2002), en maíz (Deines *et al.*, 2004) y en sorgo (Rosales-Robles *et al.*, 2005). En cultivos de remolacha el girasol silvestre fue 3 y 5 veces más competitivo que *Kochia scoparia* o *Abutilon theophrasti* (Schweizer y Bridge, 1982), mientras que en poroto fue entre 13 y 15 veces más competitivo que la gramínea *Setaria viridis* (Mesbah *et al.*, 2004).

Por otra parte, *H. annuus* constituye un recurso genético para el mejoramiento del girasol cultivado debido a la importante variabilidad de rasgos de interés. Las poblaciones silvestres han sido utilizadas para obtener resistencia a enfermedades, como la roya negra, *Puccinia helianthi* (Putt y Sackston, 1957). Uno de los ejemplos más recientes de la utilidad de este recurso fitogenético es la tolerancia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas, hallada en una población silvestre de Kansas, EEUU que había recibido siete años de tratamiento con imazetapir (Al-Khatib *et al.*, 1998). Los genes que confieren la tolerancia han sido transferidos al cultivo mediante mejora clásica, dando lugar a nuevos híbridos comerciales denominados Clearfield® (Miller y Al-Khatib, 2002; Zollinger, 2003). Esta tecnología, actualmente disponible en Argentina, ha impactado fuertemente en el sistema productivo del cultivo y muestra una adopción creciente, alcanzando para la campaña 2007/2008 el 38 % del área implantada (BASF, 2008).

Figura II: Diagrama de dispersión del análisis discriminante de 17 poblaciones norteamericanas y nueve argentinas utilizando variables métricas observadas en un jardín común. Las poblaciones argentinas se destacan en **negrita** (Origen: Presotto, 2007).



La incorporación de tolerancia a imidazolinonas (IMI) en los materiales cultivados contemporáneos podría afectar las poblaciones silvestres en contacto con el cultivo. Los cultivares IMI-tolerantes podrían transferir la tolerancia a las especies silvestres lo que dificultaría su control, limitando el uso y la durabilidad de esta tecnología. Estudios realizados en EEUU demostraron que plantas F1 surgidas de cruzamientos de plantas silvestres de *H. annuus* o *H. petiolaris* con un híbrido de girasol cultivado IMI-tolerante, fueron entre cinco y tres veces más tolerantes que sus parentales silvestres. A su vez, la retrocruza hacia su respectiva especie silvestre también aumentó la tolerancia a imazamox (Massinga *et al.*, 2003).

La tolerancia a imidazolinonas es una tecnología de empleo creciente en nuestro país, no sólo en girasol sino también en maíz, trigo y arroz (BASF, 2010). Las nuevas

malezas que pudieran surgir a partir de la transferencia del carácter IMI-tolerante podrían ser un problema para cultivos de girasol, maíz y trigo.

La transferencia del carácter tolerante de Clearfield® a las poblaciones silvestres podría también afectar su dinámica poblacional. Por ejemplo, la dormición es una característica propia de las especies silvestres que evita que las semillas germinen en condiciones adversas (Baskin y Baskin, 1998). La selección artificial ha operado en contra de esa característica, logrando genotipos con ausencia de dormición (Corbineau *et al.*, 1990). El cruzamiento entre poblaciones silvestres y cultivares IMI-tolerantes podría disminuir la dormición de sus progenies, compensando así la menor producción de semillas de las F1 debido al menor número de capítulos por planta por baja fertilidad (Mercer *et al.*, 2006 a y b). El cruzamiento entre *H. annuus* argentinos y materiales CL podría alterar la aptitud biológica de las poblaciones silvestres.

Por lo expuesto anteriormente se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- Las poblaciones de girasol silvestre de Argentina muestran diverso grado de dormición, que será alterada por el cruzamiento con un híbrido comercial de girasol IMI-tolerante.
- La mutación IMI es transferida a plantas silvestres mediante flujo génico desde el cultivo y se expresa como una tolerancia a los herbicidas tipo imidazolinonas (imazapir).
- Será posible caracterizar molecularmente las plantas tolerantes y no tolerantes al herbicida, ya que difieren en alelos que codifican variantes de la enzima AHAS.
- La producción de grano y aceite disminuirá por interferencia de las plantas de girasol silvestre que se encuentren dentro del cultivo.
- Las plantas fuera de tipo surgidas por fecundación de las líneas endocriadas por el girasol silvestre durante la producción de semilla híbrida serán fácilmente identificadas en lotes de producción. Estas plantas podrían originar poblaciones de girasol maleza.

En consecuencia, los objetivos específicos fueron:

- Estudiar condiciones de germinación a fin de cuantificar el nivel de dormición en las poblaciones y el efecto del cruzamiento con un híbrido comercial de girasol IMI-tolerante.
- Realizar cruzamientos controlados entre plantas silvestres y cultivares Clearfield® tolerantes a imazapir y estudiar el carácter en los híbridos resultantes.
- Lograr una identificación mediante marcadores moleculares, que permita determinar eficazmente si en una población silvestre hay resistencia al herbicida.
- Estimar la disminución del rendimiento y calidad de girasol por efecto de la competencia de sus parientes silvestres.
- Estimar el riesgo de aparición de poblaciones maleza de girasol a partir de plantas fuera de tipo producto de contaminación en lotes de producción de semilla híbrida de girasol.

## **Capítulo 1 : IMPACTO DE LA HIBRIDACION CON GIRASOL TOLERANTE A IMIZAZOLINONAS SOBRE LA DORMICION DE SEMILLA EN POBLACIONES DE *Helianthus annuus* L.**

Si bien la ausencia de germinación de las semillas frescas limita el uso de algunos cultivos, el mecanismo de dormición tiene robustas implicancias en la persistencia en el banco del suelo de algunas especies invasoras, incluyendo el girasol silvestre (Martínez-Ghersa y Ghersa, 2006, OECD, 2004). La dormición es una condición interna de la semilla que impide su germinación bajo adecuadas condiciones hídricas, térmicas y gaseosas (Benech-Arnold *et al.*, 2000). Hay diversos tipos de dormición de semilla: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física y combinada (física + fisiológica). Según esta clasificación, las semillas de girasol responden a una dormición fisiológica, donde un mecanismo fisiológico del embrión impide la germinación. Las estructuras que cubren el embrión como el endosperma, cubiertas seminales y las paredes del fruto indehiscente pueden participar en la dormición (Baskin y Baskin, 1998; 2004).

El pericarpio de la semilla cumple un rol muy importante ya que interviene en la dormición de la semilla afectando la germinación y el establecimiento de las plántulas, previniendo la absorción de agua y contiene inhibidores químicos. A su vez, disminuye la deshidratación de la semilla y aumenta su persistencia en el suelo (Baskin y Baskin, 1998, Hu *et al.*, 2009).

Algunos estudios han demostrado que los mecanismos que determinan la dormición fisiológica tienen componentes en el embrión y/o en las coberturas de la semilla (Baskin y Baskin, 1998). A su vez, se sugiere que la dormición depende de un balance intrínseco entre el ácido giberélico y el ácido abscísico en el embrión. Por ejemplo, el agregado de ácido giberélico en semillas recién cosechadas de *Arabidopsis thaliana* generó un incremento en la concentración de ácido abscísico lo que mantuvo una elevada relación abscísico: giberélico, disminuyendo la efectividad del agregado de giberélico. Además, la transición de semilla dormida a no dormida se caracterizó por una disminución en la sensibilidad al abscísico y un incremento en la sensibilidad al giberélico (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Esta hipótesis había sido comprobada previamente trabajando con embriones de girasol inmaduros (siete a diez días luego de la fecundación) los cuales no presentaron dormición y germinaron rápidamente aunque la

adición de ácido abscísico generó la inhibición de la germinación mientras esta hormona estuvo presente (Le Page-Degivry y Garello, 1992).

La dormición fisiológica puede romperse con sustancias químicas como nitrato de potasio, etileno, ácido giberélico, escarificación mecánica, estratificación a baja temperatura o mediante estímulos lumínicos (Baskin y Baskin, 1998). El ácido giberélico ha mostrado efectividad para la ruptura de la dormición de algunas poblaciones silvestres de *H. annuus* y *H. petiolaris* superando a otras sustancias como etanol, ácido sódico y nitrato de potasio (Seiler, 1998). En otras especies silvestres del género *Helianthus* se ha observado ruptura de la dormición con corte del extremo proximal a la corola del fruto, o escarificación con el agregado de ácido giberélico (Chandler y Jan, 1985). La combinación de escarificación mecánica y ácido giberélico sobre semillas de *H. paradoxus* resultó en porcentajes de germinación cercanos al 80%, valor cuatro veces superior al obtenido en las semillas control (Van Auken, 2001).

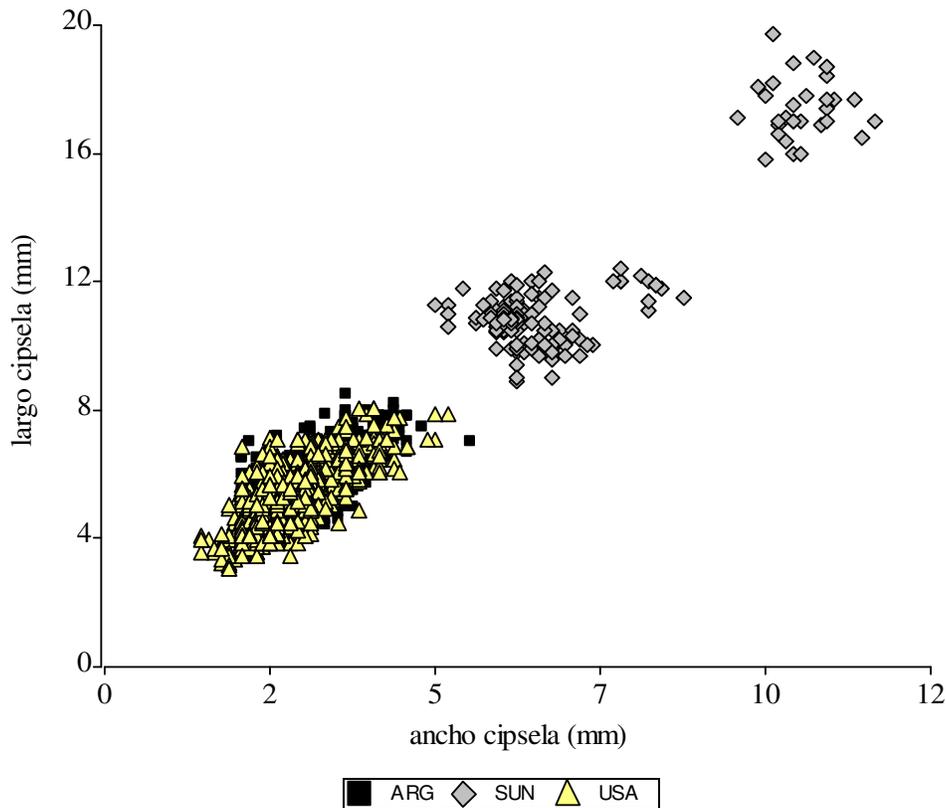
La temperatura durante el almacenamiento también es un factor ambiental que participa en la ruptura de la dormición. Generalmente las bajas temperaturas del invierno disminuyen la dormición de especies primavero-estivales y la aumentan en especies otoño-invernales (Baskin y Baskin, 1998; Milberg y Anderson, 1998). A su vez, el rango de temperatura dentro del cual se produce la germinación aumenta al perderse la dormición de las semillas. Semillas de girasol cultivado que luego de la cosecha estaban dormidas y tenían una pobre germinación, después de nueve meses de almacenamiento a 5°C germinaron bajo un rango de temperatura entre 5 y 40°C. En el mismo experimento se encontró que la germinación de semillas sin dormición estaba retardada por el pericarpio y cubiertas seminales, especialmente bajo temperaturas elevadas (Gay *et al.*, 1991).

La dormición de una especie silvestre puede ser modificada por hibridación con sus parientes cultivados (Bagavathiannan y Acker, 2008). Generalmente las semillas de las plantas híbridas tienen menor dormición que las semillas de las especies silvestres originales (Groot *et al.*, 2003). En el caso del girasol no se puede generalizar una respuesta esperada por flujo génico entre el cultivo y los parientes silvestres. La hibridación entre *H. annuus* silvestre y el cultivo disminuyó la dormición de la semilla de algunas poblaciones norteamericanas, aunque esta respuesta estuvo condicionada por

el fondo genético silvestre y de los materiales domesticados (Snow *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 2006a).

La caracterización morfológica de las cipselas de las poblaciones de *H. annuus* argentinas reveló una fuerte similitud con las provenientes de EEUU. Se observó que los parámetros descriptivos de los frutos de las poblaciones naturalizadas en Argentina se correspondieron con los valores esperados para girasol silvestre (Cantamutto *et al.*, 2008b; Figura 1.1). Sin embargo, no existe información sobre la dormición de las semillas de las poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en nuestro país ni del efecto de la hibridación con girasol doméstico.

Figura 1.1: Relación ancho/largo de cipselas de nueve poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* argentinas (ARG), 17 poblaciones norteamericanas (USA) y cinco materiales domesticados (SUN). Los puntos más alejados dentro de los materiales domesticados corresponden a un híbrido confitero (elaboración propia en base a Cantamutto *et al.*, 2008b).



Como hipótesis de trabajo se planteó que las poblaciones de girasol silvestre de Argentina muestran diverso grado de dormición, que sería alterada por el cruzamiento

con un híbrido IMI-tolerante. El objetivo fue estudiar la germinación en diversas condiciones a fin de cuantificar el nivel de dormición en diversas poblaciones y el efecto del cruzamiento con un híbrido IMI-tolerante.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Material vegetal**

El germoplasma silvestre utilizado estuvo constituido por cinco poblaciones silvestres representativas de las poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en la región central argentina (Cantamutto et al 2010b): Río Cuarto (RCU) (S 33°09', W 64°20'); Colonia Barón (BAR) (S 36°10', W 63°53'); Adolfo Alsina (AAL) (S 37°16', W 62°59'); Diamante (DIA) (S 32°03', W 60°38') y Las Malvinas (LMA) (S 34°47', W 68°15'). Como material domesticado se utilizó el híbrido comercial DK3880 CL® (IMI), cedido por Agronomía Lindon.

Se realizó un tratamiento en frío de cipselas colectadas en el sitio original, colocándolas en bandejas de plástico, entre papel secante, en heladera a 5° C por un período de una semana (ISTA, 2004). Para la cría de los plantines se utilizaron bandejas de plástico de 28 x 54 cm, con 200 celdas rellenas con sustrato a base de turba (GROW MIX®), disponiendo dos semillas por celda. Los plantines permanecieron durante 30 días luego de la emergencia en un invernadero climatizado, utilizando condiciones de luz natural y una temperatura de 25-27° C. El trasplante se efectuó cuando las plantas tenían 4-6 hojas y una altura aproximada de 10 cm.

Las cipselas para los experimentos fueron producidas en un jardín común que se realizó en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, localizado en S 38° 41' 38'' W 62° 14' 53'' durante el ciclo 2008-2009. En el campo las plantas se dispusieron agrupadas por genotipo, en líneas distanciadas a 2,10 m entre sí, con una separación entre individuos de 0,25 m. Se utilizó un sistema de riego presurizado compuesto por tuberías emisoras (m.c. UNE 68-076)-riego por goteo-operado en concordancia con las necesidades del cultivo.

Las cipselas de cada accesión fueron regenerada mediante polinización controlada de capítulos de 20-30 individuos que fueron protegidos de polen externo utilizando bolsas de papel colocadas en el estado R4, estimado por analogía con la escala de Schneiter y Miller (1981). La fecundación se realizó cada dos días utilizando polen fresco de un conjunto de individuos, colectado en los capítulos tapados de la misma accesión. La descendencia del híbrido comercial DK3880 CL fue obtenida bajo las mismas condiciones indicadas para las accesiones silvestres. Los cruzamientos controlados entre las cinco poblaciones silvestres y el girasol doméstico (F1) se realizaron siguiendo la técnica descrita por Jan y Seiler (2007). Las flores tubulares fueron emasculadas en forma manual por la mañana y polinizadas con el polen de plantas del material doméstico en la tarde del mismo día.

Al alcanzar la madurez, los capítulos fueron trillados en forma manual. Las cipselas limpias fueron almacenadas por dos semanas en un desecador que contenía silica-gel, con el objetivo de disminuir el contenido de humedad de las mismas. Posteriormente se colocaron en bolsas de aluminio trilaminadas y se mantuvieron a 5 °C durante el período que duraron todos los experimentos.

### **Ajuste de las condiciones experimentales**

#### **Prueba de imbibición**

Se estudió el efecto de la escarificación sobre la dinámica de la imbibición utilizando cipselas de la población de *H. annuus* de DIA cosechada en el jardín común y almacenadas por 12 meses a 5° C. La escarificación mecánica se realizó utilizando una lijadora orbital automática provista con una lija para madera (A180) que fue apoyada y activada durante tres segundos sobre una capa fina de semillas que estaban dispuestas sobre otra lija de la misma granulometría (Figura 1.2). Luego de la escarificación las cipselas fueron colocadas en cajas de Petri conteniendo 10 ml de agua y almacenadas en una cámara de germinación a 20°C (ISTA, 2004) con fotoperíodo de 12 horas (neutro). Como control se utilizaron grupos de cipselas de la misma partida, sin escarificar. Las semillas fueron pesadas al inicio de la prueba (0h) y a las 5, 10, 15, 20, 25 y 30 h de imbibición. Cada unidad experimental estuvo constituida por grupos de 50 semillas y el diseño fue completamente al azar con tres repeticiones. La imbibición de agua fue expresada como porcentaje de incremento en peso, de la siguiente forma:

Incremento en peso (%) =  $((Pf - Pi)/Pi) \times 100$

Siendo Pf=peso final de las 50 cipselas y Pi= peso inicial de las 50 cipselas. Se realizó un ANOVA para cada momento de imbibición y la expresión gráfica de los resultados mediante el paquete estadístico Infostat (2008).

Figura 1.2: Efecto de la escarificación de cipselas de *Helianthus annuus*. Cipselas escarificadas (EM), semillas sin escarificar (no).



### Respuesta a la luz

Para evaluar la respuesta a la luz se utilizaron cipselas de la población de DIA y la descendencia del híbrido DK3880 CL producidas en el jardín común. La fuente de iluminación fueron cinco tubos fluorescentes (F36W/54), que producen mayoritariamente luz roja promotora de la germinación (Baskin y Baskin, 1998). Las semillas se colocaron sobre papel absorbente utilizando bandejas plásticas de 3,5 x 3,5 cm. En el tratamiento de germinación bajo oscuridad, las bandejas fueron cubiertas con papel aluminio. Las cipselas se colocaron en una cámara a 20°C y fotoperíodo neutro durante 15 días. Las bandejas permanecieron sin abrir durante todo el ensayo para evitar el ingreso de luz en los tratamientos con oscuridad. El ensayo se repitió luego de 12 meses de almacenamiento a 5°C, con el genotipo silvestre.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas y unidades experimentales de 25 cipselas. Los datos, previa transformación por arcoseno, se analizaron mediante ANOVA considerando como fuentes de variación el genotipo (silvestre o cultivado), iluminación (con luz o sin luz). Para el análisis conjunto los dos períodos extremos de almacenamiento a 5°C (0 y 12 meses) fueron considerados bloques.

#### Respuesta a la temperatura

Se evaluó la respuesta a la temperatura de las cinco poblaciones invasoras y sus cruzas controladas con DK3880 CL generadas en el jardín común inmediatamente luego de la maduración, a los seis y doce meses de almacenaje seco en frío utilizando una plancha de gradiente térmico. Este aparato consta de un sistema de refrigeración en un extremo y en el otro un sistema de calefacción. Entre estos sistemas se encuentra una plancha de aluminio de 28 cm de ancho por 100 cm de largo en donde se genera el gradiente de temperaturas (Hernández y Paoloni, 1998). Sobre la plancha se colocó papel absorbente que fue humedecido y se utilizó un termómetro infrarrojo para calibrar y monitorear la temperatura.

Luego de cada período de almacenamiento considerado los genotipos se dispusieron sobre el papel absorbente en grupos de 25 cipselas, evitando el contacto entre ellas. Los grupos estaban centrados sobre las líneas perpendiculares al gradiente que registraban las siguientes seis temperaturas de estudio: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C. Bajo estas condiciones experimentales cada grupo de cipselas se mantuvo en un rango máximo de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . El fotoperíodo fue constante de 12 horas, utilizando iluminación artificial con tubos fluorescentes. Se registró diariamente la germinación durante 15 días.

Se calculó la temperatura de máxima germinación (TMG) como la temperatura en la cual germinaron la mayor cantidad de semillas. Esto se realizó para cada uno de los días ensayados. Los datos se analizaron mediante ANOVA, previa transformación por arcoseno, considerando un diseño de bloques aleatorizados. Las fuentes de variación fueron: generación (población o F1) y temperatura mientras que el tiempo de almacenamiento a 5°C se consideró como bloque.

### **Ruptura de la dormición**

Se evaluó la pérdida de la dormición de las semilla de las cinco poblaciones y sus cruzas controladas con DK 3880 CL generadas en el jardín común inmediatamente luego de la maduración, a los seis y 12 meses de almacenaje seco o estratificación. La ruptura artificial de la dormición fue promovida por tres acondicionamientos. El acondicionamiento con frío consistió en colocar las cipselas en bandejas sobre papel húmedo tapadas con bolsas de polietileno transparente durante una semana a 5 °C (ISTA, 2004). Para el acondicionamiento con ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) las cipselas se colocaron en bandejas con papel absorbente humedecido con una solución de 1 mM de AG<sub>3</sub> (Seiler, 1998). El acondicionamiento de escarificación mecánica se realizó utilizando una lijadora orbital automática, operada conforme la metodología descrita previamente. Como control se utilizaron semillas de cada uno de los genotipos que no recibieron ningún acondicionamiento La germinación se evaluó en bandejas de plástico con papel absorbente que fue humedecido con agua destilada en una cámara de germinación a 20 °C con un fotoperíodo de 12 horas durante 15 días. Al final de ese período se realizó una prueba de viabilidad de las semillas que no habían germinado. Para ello las cipselas fueron cortadas longitudinalmente y colocadas en una solución 0,5% de cloruro de 2,3,5 trifenil-tetrazolio a temperatura ambiente durante 24 horas (ISTA, 2004).

Los datos se analizaron mediante ANOVA, previa transformación por arcoseno, mediante un diseño de bloques aleatorizados. Las fuentes de variación fueron: genotipo, generación (población o F1) y acondicionamiento mientras que el tiempo de almacenamiento a 5°C se consideró como bloque.

Con la información obtenida en el último ensayo, luego de 12 meses de estratificación a 5°C, se calculó el tiempo de germinación del 50% de las semillas (TG50) de las cinco poblaciones silvestres de girasol. Se evaluó el efecto de la escarificación mecánica y del cruzamiento con el híbrido comercial IMI-tolerante. Para esto se construyeron curvas de germinación siguiendo la metodología de modelos de regresión no-lineal. La evolución de las semillas germinadas ajustó con un modelo logístico con tres parámetros (Chauhan *et al.*, 2006), según la siguiente ecuación:

$$f [x, (b, d, e)] = \{d / 1 + \exp b[\log(x) - \log(e)]\}$$

Donde **d** fue el máximo porcentaje de germinación, **e** es el tiempo que tarda en germinar el 50% de las semillas (TG50) y **b** es la pendiente relativa alrededor de e. Los datos fueron analizados utilizando la aplicación *drc* del paquete estadístico R (Knezevic *et al.*, 2007). Más detalles sobre esta metodología se incluyen en el Capítulo 2 donde se la utiliza nuevamente para los ensayos dosis-respuesta.

Con la información obtenida en el ensayo de ruptura de la dormición se estimó la proporción de semillas SIL:F1 germinadas bajo dos escenarios extremos. En el escenario 1: todas las semillas despiertas germinan en la primavera luego de estar seis meses invernando (G6). La proporción SIL:F1 de cada población se estimó de la siguiente manera:

$$P(\text{SIL}) = G6(\text{SIL}) / (G6(\text{SIL}) + G6(\text{F1}))$$

Donde P(SIL) es la proporción de semillas de SIL germinadas en relación a las semillas de su respectiva F1 germinadas. G6 es el porcentaje de semillas germinadas luego de seis meses de almacenamiento a 5 °C.

En el escenario 2: sólo germina la semilla que despierta luego del período invernal (G6-G0) ya que las que germinaron luego de la cosecha son eliminadas durante el invierno. La proporción SIL: F1 de cada población se estimó de la misma forma que la ecuación previa salvo que G6 fue reemplazado por la diferencia (G6-G0) entre el porcentaje de semillas germinadas luego de la cosecha (G0) y aquellas que germinaron luego de seis meses de almacenamiento a 5 °C (G6).

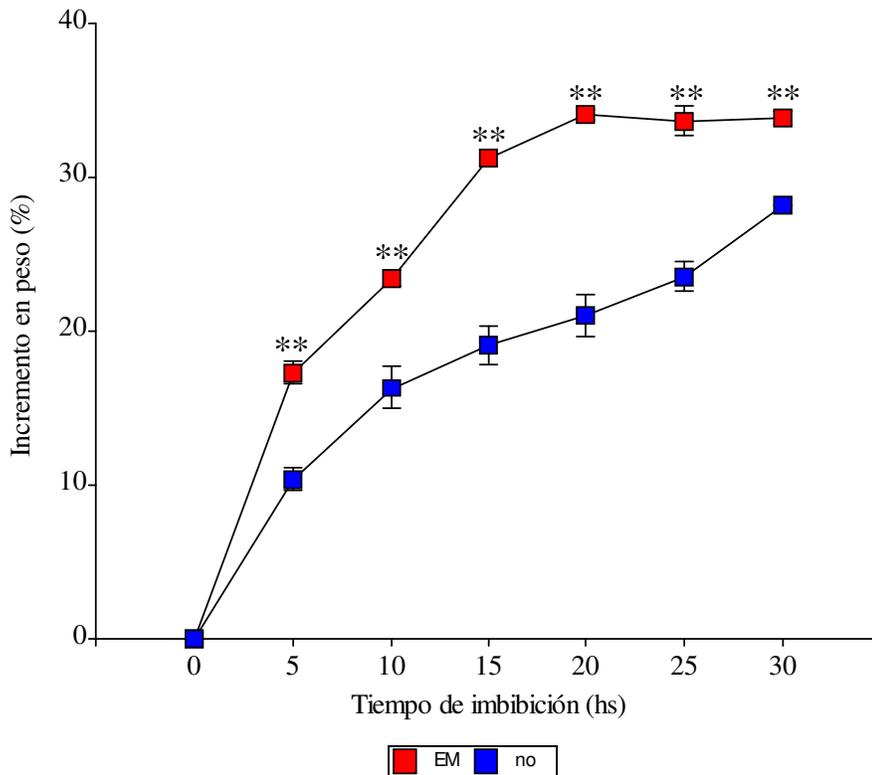
## **RESULTADOS**

Luego de un año de estratificación a 5°C se realizó la prueba de tetrazolio sobre las semillas no germinadas en el ensayo que se realizó en la cámara de germinación. La prueba reveló que el 99% de las semillas se encontraba viable, con un rango de 97 a 100%. No se detectaron diferencias entre tratamientos ni generaciones (SIL o F1).

### Prueba de imbibición

La escarificación de las cipselas aumentó significativamente la absorción de agua durante las primeras 30 horas de imbibición (Figura 1.3) Durante el período evaluado se observó que las diferencias fueron mayores a las 15 y 20 h de iniciada la imbibición pero tendieron a disminuir hacia el final de la prueba, a las 30 h.

Figura 1.3: Efecto de la escarificación sobre el incremento en peso (%) de semillas de *Helianthus annuus* silvestre durante las primeras 30 horas de imbibición en agua destilada a 20°C y fotoperíodo neutro. EM: escarificación mecánica, no: control.



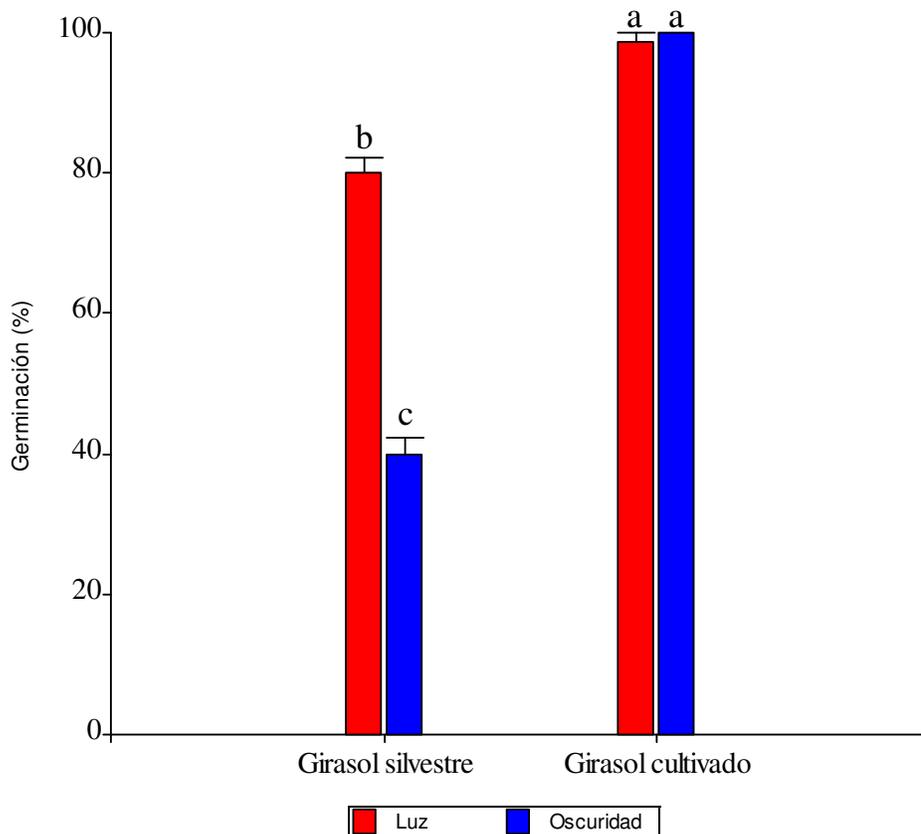
\*\* :diferencias altamente significativas,  $p < 0,01$ .

### Respuesta a la luz

Mientras que la germinación de las semillas del girasol cultivado no respondieron a la iluminación, las del *H. annuus* silvestre (DIA) sí lo hicieron. En DIA se detectó un efecto altamente significativo de la iluminación y del tiempo de almacenamiento aunque la interacción entre ambas fuentes no fue significativa; por lo tanto, los resultados se agruparon en función de la iluminación. En este caso la germinación bajo el estímulo lumínico superó el 75%, mientras que en oscuridad sólo germinó el 42% de las semillas

(Figura 1.4). La respuesta del genotipo silvestre al estímulo lumínico no se modificó con el envejecimiento de la semilla durante el almacenamiento por un año en frío seco.

Figura 1.4: Efecto del estímulo lumínico sobre la germinación de una población silvestre de *Helianthus annuus* proveniente de Diamante (Entre Ríos) y la descendencia de un híbrido comercial de girasol cultivado inmediatamente luego de la maduración.



Letras distintas sobre las barras indican diferencias según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Respuesta a la temperatura

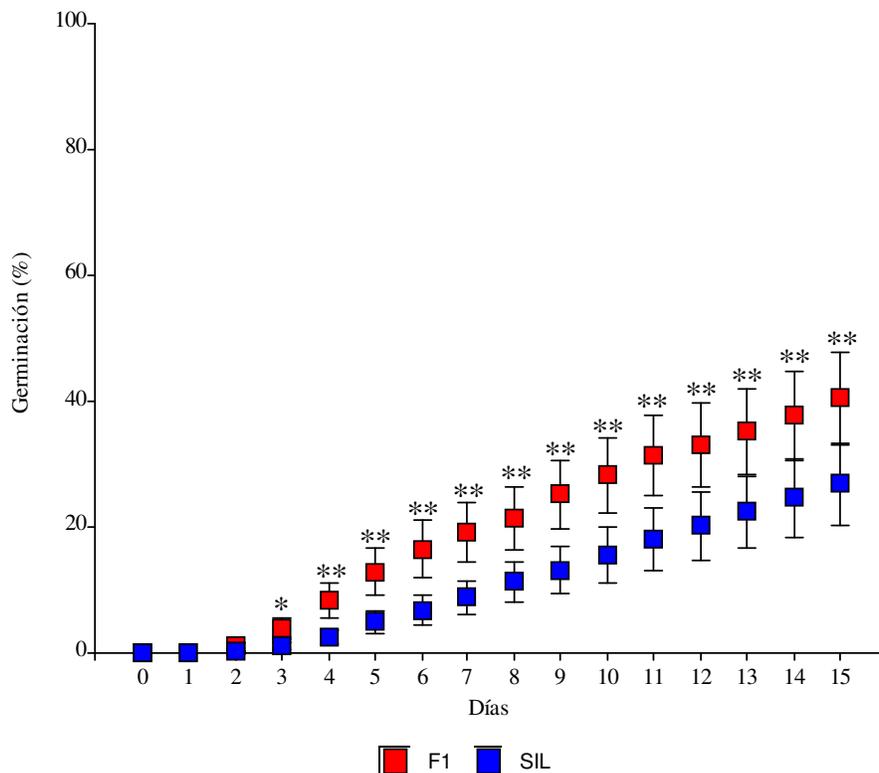
El ANOVA mostró efecto de las temperaturas, generación y del período de almacenamiento a 5°C sobre la germinación. En este análisis se excluyó a la población de Colonia Barón y su cruce con DK3880 CL debido a que en los tres períodos de análisis presentó escasa germinación (<50%). Se encontró efecto de la temperatura y de la generación a partir del tercer día de evaluación en la plancha de gradiente térmico. El efecto del envejecimiento de la semilla por almacenamiento en seco a 5°C fue significativo en siete de los 15 días de evaluación, concentrándose particularmente en los últimos dos días del ensayo. No se encontró interacción entre el tiempo de almacenamiento y las generaciones, mientras que la interacción tiempo de

almacenamiento por temperatura fue significativa sólo para el día tres. La interacción temperatura por generación fue significativa ocho de 15 días, aunque en los últimos cuatro días de evaluación no se detectó interacción (Tabla 1.1).

Se pudo observar que a partir del segundo día y hasta el cuarto, la TMG fue de 25°C. Luego del tercero y hasta el onceavo día, la TMG fue de 20°C. Por último, desde el noveno y hasta el último día del ensayo, 15°C fue la TMG para las poblaciones silvestres y sus respectivas F1 (Tabla 1.1).

A partir del tercer día de iniciada la prueba y hasta el final del ensayo, las F1 presentaron mayor germinación que sus poblaciones parentales. El cruzamiento con el híbrido comercial DK3880 CL aumentó en promedio un 55%, la germinación de las poblaciones originales (Tabla 1.1; Figura 1.5).

Figura 1.5: Germinación acumulada (media  $\pm$  error estándar) de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y su cruce con un cultivar de girasol IMI-tolerante (F1) durante 15 días en un ensayo de gradiente térmico.



\*: diferencias significativas,  $p < 0,05$ . \*\*:diferencias altamente significativas,  $p < 0,01$ .

El almacenamiento a 5°C aumentó la germinación en forma significativa. El incremento fue significativo para los días 3, 4, 8, 9, 10, 12, 14 y 15 de la evaluación. Si bien el aumento de la germinación fue gradual, las diferencias entre las semillas recién cosechadas y aquellas almacenadas en frío fueron significativas recién a los 12 meses (Tabla 1.1).

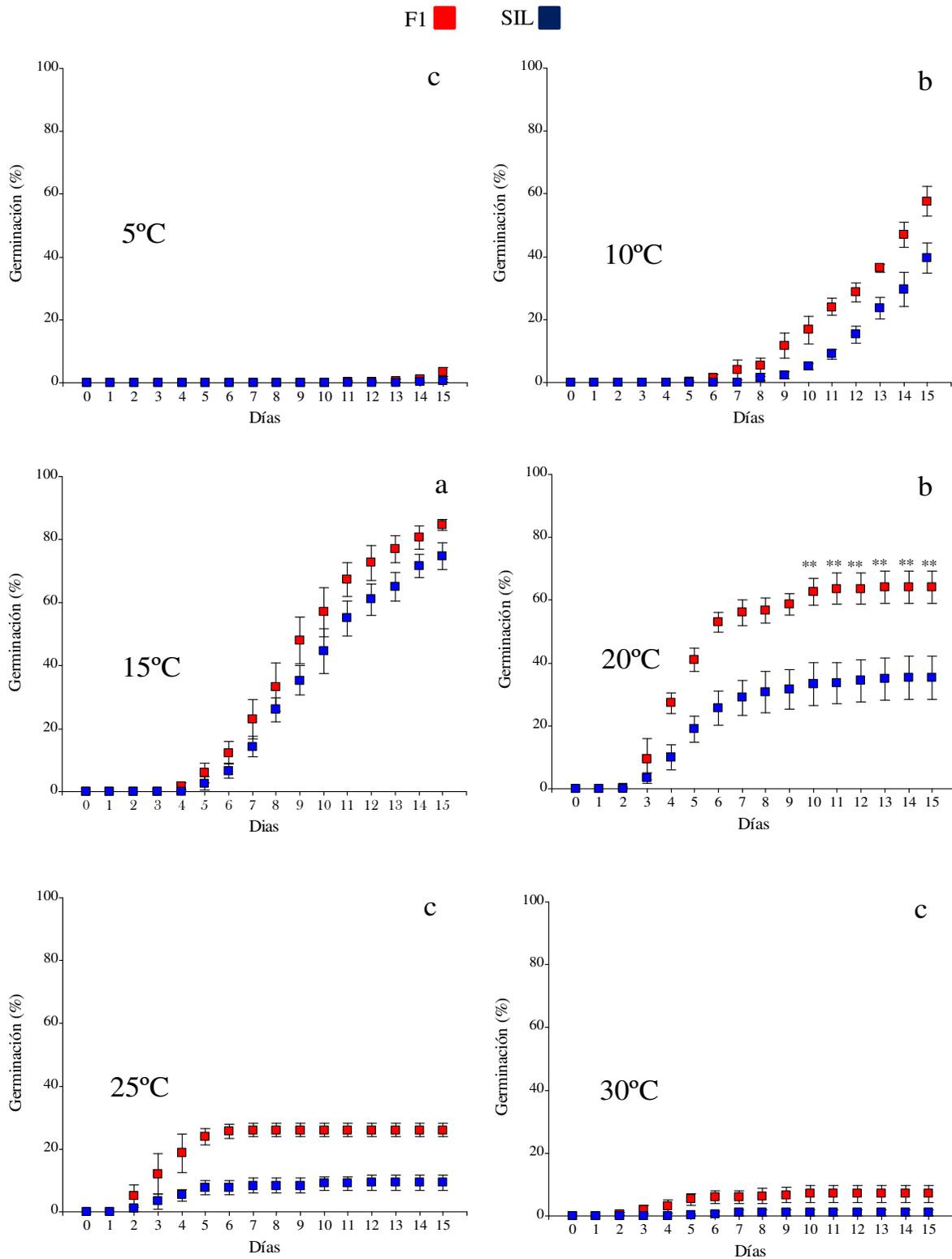
Considerando la germinación bajo cada temperatura, el porcentaje de semillas germinadas a 5° y 30°C, las temperaturas extremas del ensayo, fue menor al 5% en promedio. A 25°C de temperatura, la germinación fue rápida ya que a partir del segundo día se detectó germinación aunque se detuvo a partir del quinto día, llegando a 18% de germinación. A su vez, no se detectaron diferencias significativas entre esta temperatura y la germinación a 5 o a 30°C. Contrariamente, a 15°C se alcanzó el mayor porcentaje de germinación que superó el 82%. A 20°C la germinación fue menor, 52% en promedio, pero permitió diferenciar las generaciones (SIL vs. F1), siendo la germinación de las cruas controladas superior a la alcanzada por las poblaciones originales. Por último, a 10°C la germinación comenzó, en forma tardía, luego de seis días de iniciado el ensayo, aunque la evolución fue progresiva y continua lo que permitió alcanzar en promedio el mismo valor que a 20°C (Figura 1.6).

Tabla 1.1: Germinación diaria en poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y sus respectivas progenies (F1) con un híbrido comercial CL en función del tiempo de almacenamiento (0, 6 y 12 meses) en un ensayo de gradiente térmico bajo seis temperaturas y fotoperíodo neutro, durante un período de 15 días. Bajo cada día se encuentra el ANOVA con sus fuentes de variación e interacciones. TMG: Temperatura diaria con mayor porcentaje de germinación.

	Días															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TMG (°C)	nc	nc	25	25/20	25/20	20	20	20	20	20/15	20/15	20/15	15	15	15	15
<b>Germinación (%)</b>																
Generación																
F1	0	0	0	4 a	9 a	13 a	17 a	20 a	23 a	27 a	31 a	34 a	36 a	39 a	42 a	45 a
SIL	0	0	1	1 b	3 b	5 b	7 b	9 b	11 b	14 b	16 b	19 b	22 b	24 b	27 b	29 b
Almacenamiento (meses)																
0	0	0	0	0 b	3	7	9	11	13 b	16 b	18 a	22	24 a	27	28 a	32 a
6	0	0	1	4 a	7	11	14	16	18 ab	21 ab	25 ab	28	31 ab	32	35 ab	38 ab
12	0	0	0	4 a	7	10	14	18	21 a	25 a	29 b	31	33 b	35	39 b	42 b
<b>ANOVA</b>																
Almacenamiento (a)	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	ns	*	ns	*	*
Temperatura (T)	ns	ns	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Generación (g)	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Interacciones																
a*T	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
a*g	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T*g	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). nc: no corresponde, ns: no significativo, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Figura 1.6: Germinación acumulada (media  $\pm$  error estándar) de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y sus progenies (F1) con un híbrido comercial CL bajo seis temperaturas y fotoperíodo neutro.



Letras distintas indican diferencias en la germinación final entre temperaturas. \*\*: diferencias entre generaciones (SIL vs. F1).

### Ruptura de la dormición

En la Tabla 1.2 se detallan los resultados del ANOVA donde se observan diferencias altamente significativas entre las poblaciones, el tiempo de almacenamiento a 5°C, los acondicionamientos y la generación (SIL vs. F1). A su vez, la mayoría de las interacciones fueron altamente significativas, excepto tiempo de almacenamiento por generación, tiempo de almacenamiento por acondicionamiento por generación y la interacción cuádruple población por tiempo de almacenamiento por acondicionamiento por generación (Tabla 1.2).

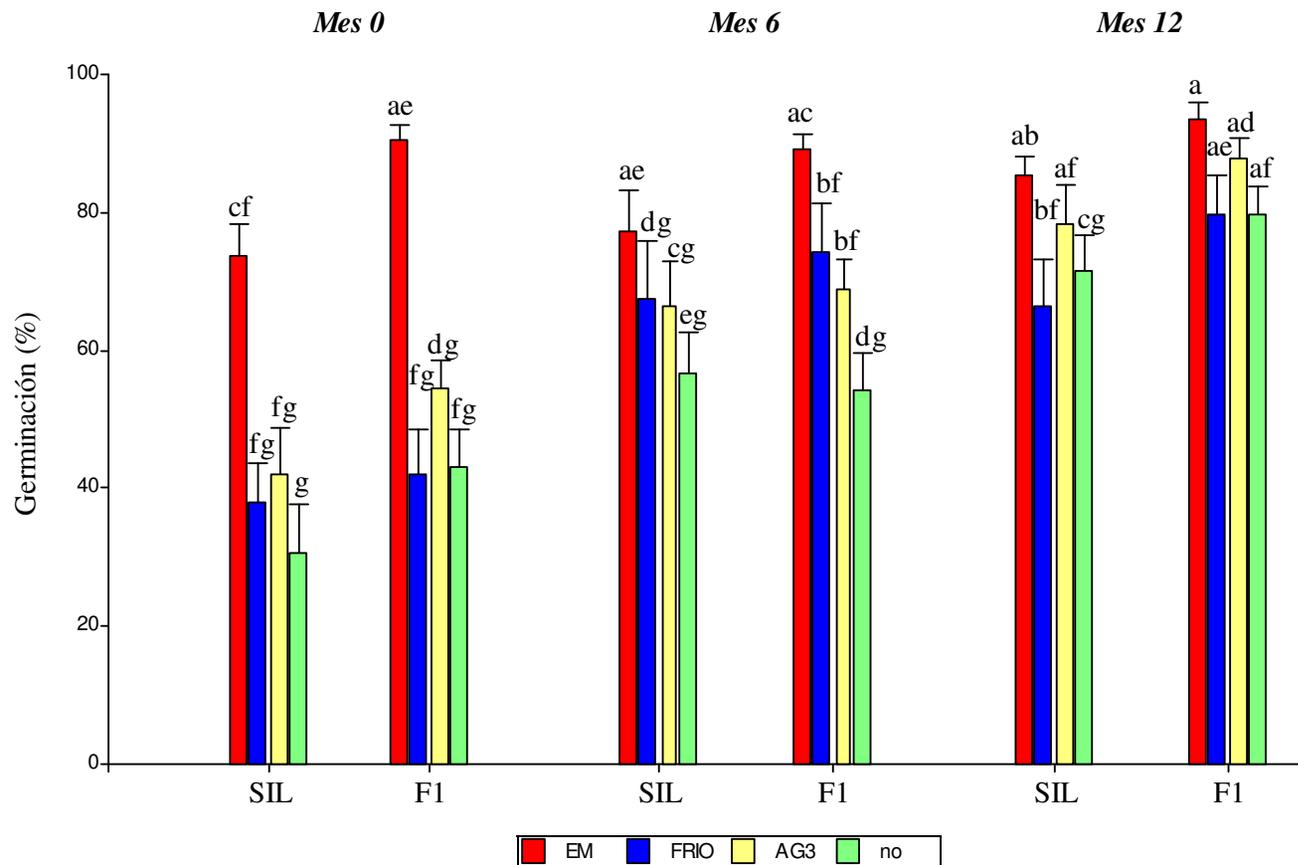
En general, la EM aumento la germinación en semillas recién cosechadas de SIL y F1. El envejecimiento de la semilla fue aumentando la germinación y en consecuencia, disminuyeron las diferencias con EM. El frío y el AG<sub>3</sub> no tuvieron efecto sobre la ruptura de la dormición. El tiempo de almacenamiento a 5°C aumentó la germinación aunque sin detectarse diferencias significativas. La germinación de las semillas F1 luego de 12 meses de almacenamiento fue levemente superior aunque sin detectarse diferencias estadísticas (Figura 1.7).

Como las demás interacciones fueron altamente significativas se decidió comparar cada una de las poblaciones silvestres con su respectiva F1 obtenidas por cruzamiento con un híbrido comercial CL.

Tabla 1.2: Análisis de varianza de la germinación de cinco poblaciones de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y sus respectivas progenies (F1) con un híbrido comercial CL, utilizando tres acondicionamientos y tres períodos de almacenamiento seco a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperíodo neutro.

F.V.	CM	F	
Modelo	0,56	18,30	**
población (pob)	5,29	172,18	**
tiempo (t)	5,03	163,65	**
acondicionamiento			
(acon)	4,90	159,31	**
generación (g)	1,74	56,75	**
pob*t	0,51	16,74	**
pob*acon	0,18	5,89	**
pob*g	0,59	19,26	**
t*acon	0,45	14,53	**
t*g	0,06	1,85	ns
acon*g	0,28	8,96	**
pob*t*acon	0,13	4,22	**
pob*t*g	0,15	4,74	**
pob* acon*g	0,08	2,55	**
t* acon*g	0,05	1,77	ns
pob*t* acon*g	0,04	1,24	ns
Error	0,03		

Figura 1.7: Germinación (%) de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y de sus respectivas cruzas con un híbrido comercial CL (F1) en función del tiempo de almacenamiento a 5°C y los sistemas de acondicionamiento. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey. ( $p < 0,05$ ).

Tabla 1.3: Germinación (%) de semillas sin acondicionamiento de cinco poblaciones de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y sus respectivas progenies con un híbrido comercial CL (F1) en función del tiempo de estratificación a 5°C (TE).

Población	TE (meses)					
	SIL			F1		
	0	6	12	0	6	12
AAL	15 c	43 c	83 ab	40 c	55 bc	89 a
BAR	12 b	36 ab	44 a	30 ab	25 ab	52 a
DIA	77 b	97 a	98 a	74 b	75 b	90 ab
LMA	15 d	59 bc	74 ab	23 cd	75 ab	93 a
RCU	19 b	46 ab	75 a	39 ab	51 ab	77 a

Letras diferentes dentro de cada población indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabla 1.4: Germinación (%) de semilla recién cosechada de cinco poblaciones de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y sus respectivas progenies con un híbrido comercial CL (F1) en función de los sistemas de acondicionamiento para romper la dormición.

Población	Acondicionamiento							
	SIL				F1			
	EM	AG <sub>3</sub>	FRIO	no	EM	AG <sub>3</sub>	FRIO	no
AAL	95 a	20 b	33 b	15 b	99 a	48 b	39 b	40 b
BAR	44 bc	27 bd	24 cd	12 d	77 a	47 b	17 d	30 bd
DIA	92 ab	88 ac	79 bc	77 c	96 a	76 c	84 ac	74 c
LMA	79 b	41 c	31 c	15 c	98 a	36 c	31 c	23 c
RCU	66 ab	34 bc	21 c	19 c	91 a	65 ab	41 bc	39 c

Letras diferentes dentro de cada población indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Adolfo Alsina (AAL)

El tiempo de almacenamiento, acondicionamiento, generación y la interacción tiempo de almacenamiento por acondicionamiento tuvieron efectos altamente significativos sobre la germinación (Tabla 1.5).

El envejecimiento durante el almacenamiento bajo condiciones de frío seco aumentó la germinación de las semillas. Luego de la cosecha, la germinación fue baja en la

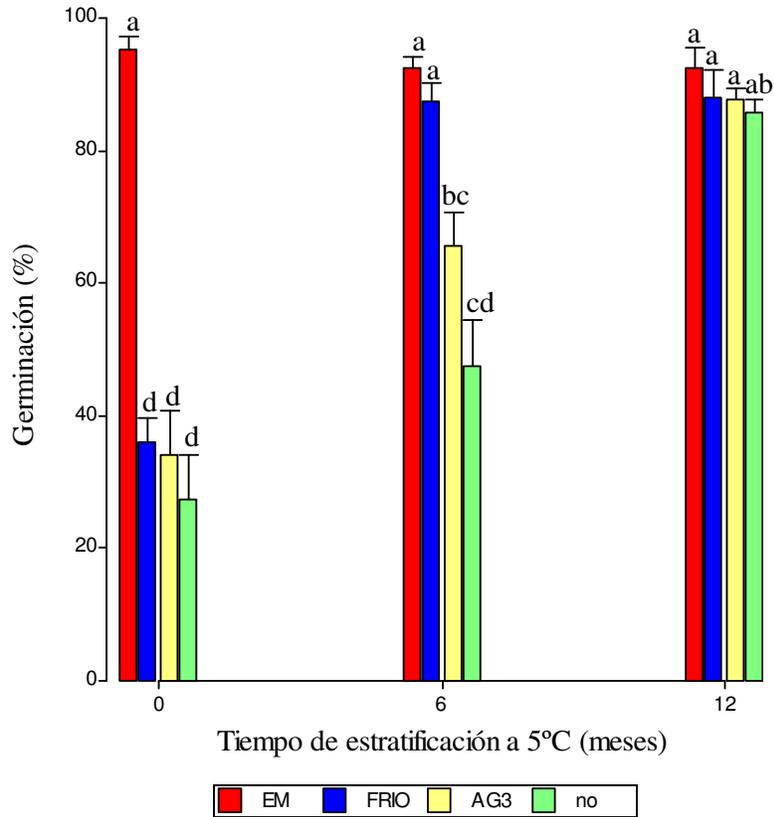
población silvestre como en su F1. Luego de 12 meses de estratificación a 5°C, la germinación superó el 80% para ambos grupos, sin diferenciarse entre sí. EM fue el método de acondicionamiento más efectivo en romper la dormición tanto de las semillas SIL como las F1, mientras que los demás acondicionamiento no lo fueron (Tabla 1.3 y 1.4).

Tabla 1.5: Análisis de varianza de germinación de una población de *Helianthus annuus* silvestre proveniente de Adolfo Alsina (Buenos Aires) y de su cruce con un cultivar de girasol CL, bajo cuatro acondicionamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperiodo neutro.

FV	CM	F	
Modelo	0,55	18,02	**
tiempo(t)	1,61	52,80	**
acondicionamiento (acon)	1,90	62,13	**
generación(g)	0,74	24,12	**
t*acon	0,46	15,11	**
t*g	0,00	0,12	ns
acon*g	0,00	0,11	ns
Error	0,03		

En la semilla recién cosechada la EM aumentó significativamente la germinación respecto a los otros sistemas de ruptura de la dormición. Luego de seis meses de almacenamiento bajo condiciones de frío seco el tratamiento en frío y la EM produjeron los valores más altos de germinación diferenciándose significativamente del tratamiento con AG<sub>3</sub> y el testigo, que presentaron valores similares entre sí. Después de 12 meses de estratificación a 5°C no se observaron diferencias entre los distintos sistemas de ruptura de la dormición y el control (Figura 1.8).

Figura 1.8: Germinación (%) de un biotipo (población y F1) de *Helianthus annuus* proveniente de Adolfo Alsina (Buenos Aires) en función del tiempo de estratificación a 5°C y de cuatro tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Colonia Barón (BAR)

Las tres fuentes de variación tuvieron efectos altamente significativos sobre la germinación, al igual que la interacción acondicionamiento por generación (Tabla 1.6).

En SIL, el tiempo de almacenamiento en frío seco aumentó la germinación de semillas. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre las semillas recién cosechadas y aquellas con seis meses de almacenaje. Luego de 12 meses de estratificación a 5°C, la germinación aumentó más de tres veces el valor original. En las F1, si bien hubo un aumento de la germinación a los 12 meses de almacenamiento no se diferenció estadísticamente de la semilla fresca. El cruzamiento con el híbrido de girasol CL aumento la germinación luego de 12 meses de almacenamiento en seco aunque este

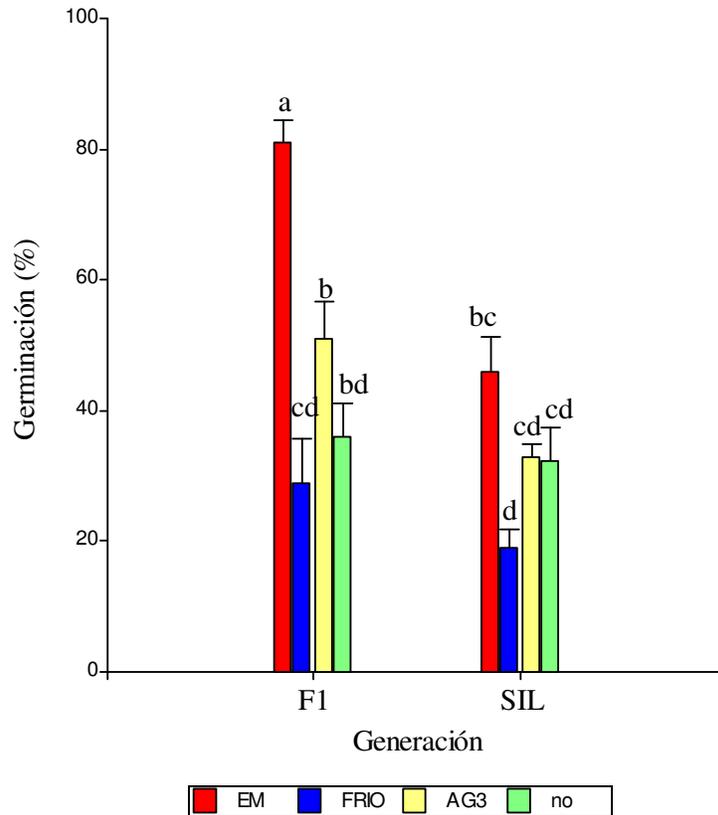
valor no se diferenci6 del alcanzado por las semillas SIL. La EM fue el acondicionamiento m6s efectivo tanto en SIL como en sus F1 diferenci6ndose significativamente de los restantes acondicionamientos. (Tabla 1.3 y 1.4).

Tabla 1.6: An6lisis de varianza de germinaci6n de una muestra de poblaci6n de *Helianthus annuus* silvestre proveniente de Colonia Bar6n (Buenos Aires) y de su cruce con un h6brido comercial de girasol CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificaci6n a 5°C, luego de 15 d6as a 20°C y fotoper6odo neutro.

F.V.	CM	F	
Modelo	0,43	15,77	**
tiempo(t)	0,83	30,45	**
acondicionamiento			
(acon)	1,17	43,23	**
generaci6n(g)	1,19	43,85	**
t*acon	0,04	1,37	ns
t*g	0,05	1,84	ns
acon*g	0,20	7,27	**
Error	0,03		

Se encontr6 interacci6n entre los tratamientos y las generaciones. La EM fue significativamente efectiva en romper la dormici6n en la F1 proveniente de la poblaci6n de *H. annuus* silvestre de Colonia Bar6n y el h6brido comercial de girasol CL. En cuanto a la dormici6n de las semillas de la poblaci6n silvestre, ninguno de los tres tratamientos se diferenci6 del testigo (Figura 1.9).

Figura 1.9: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Colonia Barón (La Pampa) en función de los tratamientos y generaciones. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Diamante (DIA)

La germinación de la accesión de DIA tuvo efectos altamente significativos para las tres fuentes de variación y la interacción tiempo de almacenamiento por generación (Tabla 1.7).

El almacenamiento en seco a 5°C aumentó la germinación de las semillas. En SIL, luego de seis meses hubo un aumento significativo de la germinación mientras que para la F1 este aumento se produjo luego de 12 meses de estratificación. Al año las semillas de ambos grupos tuvieron un aumento de germinación superior al 20%. Si bien las semillas de SIL presentaron un valor final superior a sus F1, esta diferencia no fue significativa. Entre los acondicionamientos utilizados la EM fue el único que se diferenció del testigo,

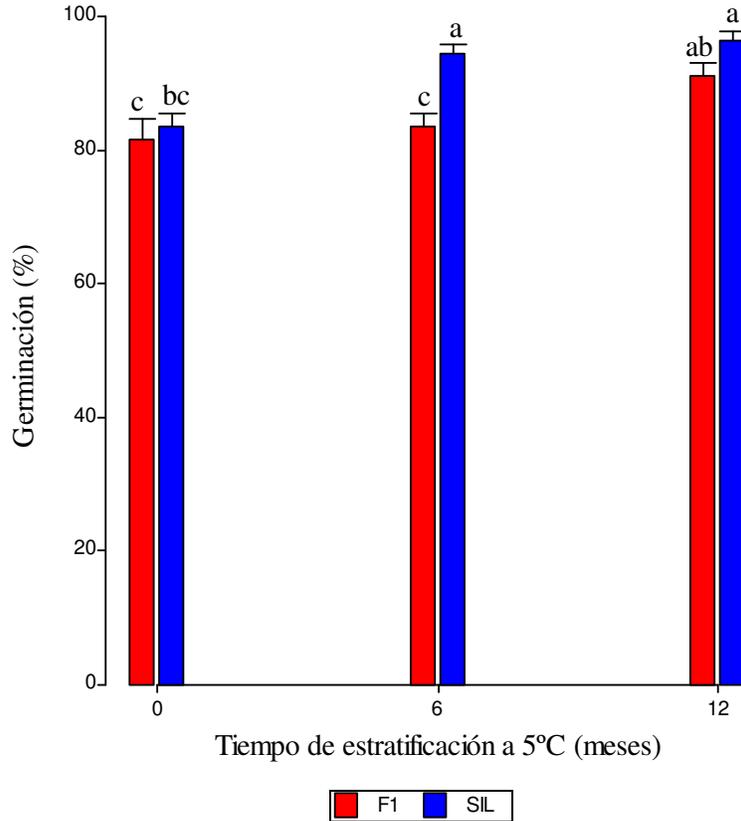
aumentando el 20 y 30 % la germinación en SIL y F1, respectivamente. (Tabla 1.3 y 1.4).

Tabla 1.7: Análisis de varianza de germinación de una población de *Helianthus annuus* silvestre proveniente de Diamante (Entre Ríos) y de su cruce con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperiodo neutro.

F.V.	CM	F	
Modelo	0,19	6,06	**
tiempo(t)	0,57	18,64	**
acondicionamiento			
(acon)	0,30	9,62	**
generación(g)	0,57	18,56	**
t*acon	0,02	0,80	ns
t*g	0,13	4,29	*
acon*g	0,05	1,67	ns
Error	0,03		

Se detectó interacción entre el tiempo de estratificación a 5°C y las generaciones. La germinación de semilla en SIL aumentó luego de seis meses de almacenamiento mientras que las semillas de la F1 se diferenciaron de las semillas frescas luego de 12 meses de estratificación a 5°C. (Figura 1.10).

Figura 1.10: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Diamante (Entre Ríos) en función del tiempo de estratificación a 5°C y las generaciones. SIL: *H. annuus* silvestre, F1: cruzamiento silvestre-cultivado.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Las Malvinas (LMA)

Las tres fuentes de variación fueron altamente significativas. A su vez, las tres interacciones fueron altamente significativas (Tabla 1.8).

El tiempo de estratificación a 5°C aumentó la germinación de las semillas de SIL y F1. En ambos casos, el mayor aumento se produjo luego de seis meses de almacenamiento siendo más de tres veces el valor de germinación de la semilla fresca. Al año la germinación de la semilla F1 fue superior a la SIL aunque no se diferenció estadísticamente. La EM fue nuevamente el acondicionamiento más eficaz en romper la dormición de semilla fresca aumentando en más de cuatro veces la germinación. Los demás acondicionamientos no difirieron del control. (Tabla 1.3 y 1.4).

Tabla 1.8: Análisis de varianza de germinación de una población de *Helianthus annuus* silvestre proveniente de Las Malvinas (Mendoza) y de su cruce con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperiodo neutro.

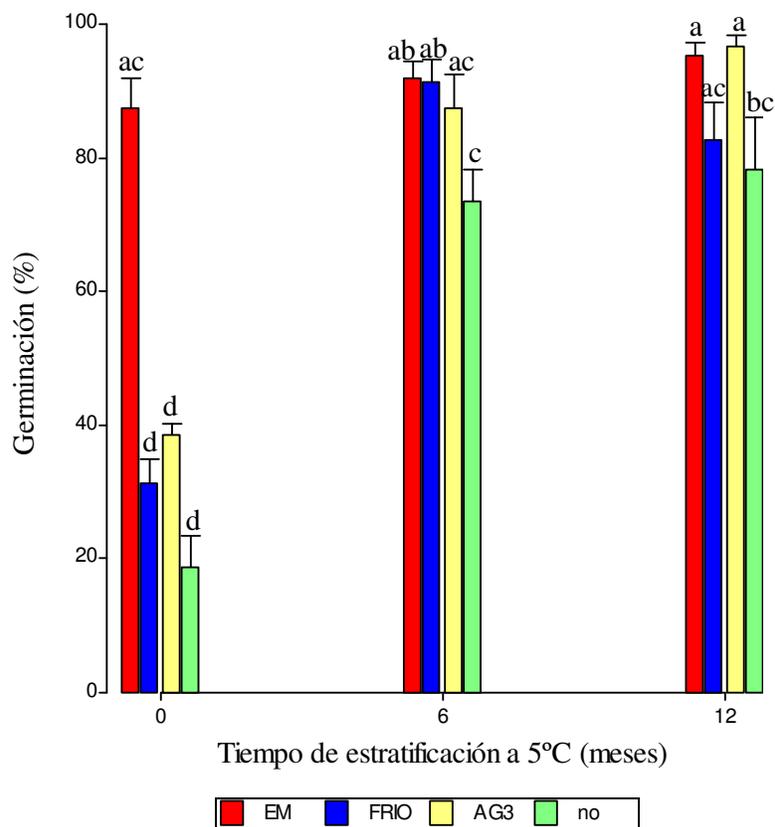
F.V.	CM	F	
Modelo	0,84	24,03	**
tiempo(t)	3,09	88,41	**
acondicionamiento			
(acon)	1,30	37,17	**
generación(g)	0,57	16,20	**
t*acon	0,34	9,80	**
t*g	0,40	11,49	**
acon*g	0,26	7,38	**
Error	0,03		

Se encontró interacción entre el tiempo de estratificación y los tratamientos. Previo a la cosecha, EM fue el único tratamiento que se diferenció significativamente del testigo. Luego de seis meses a 5°C, los tres tratamientos fueron igualmente eficaces en romper la dormición de las semillas. Pasados 12 meses de escarificación, EM y AG<sub>3</sub> fueron los tratamientos que mayores niveles de germinación mostraron (Figura 1.11).

Se detectó interacción entre el tiempo de estratificación y las generaciones. La germinación de la semilla SIL fue gradual, alcanzando su máximo valor luego de 12 meses de almacenamiento mientras que las semillas F1 se despertaron antes, luego de 6 meses de estratificación a 5°C. (Figura 1.12).

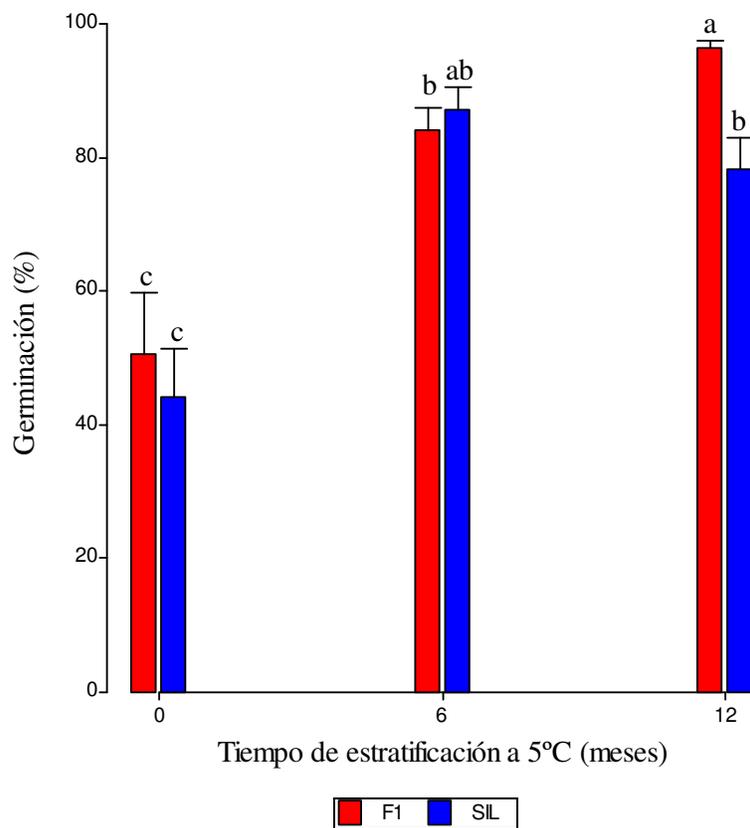
Finalmente, hubo interacción entre los tratamientos y las generaciones. Para el caso de la población silvestre, EM, frío como AG<sub>3</sub> presentaron un porcentaje de germinación superior al testigo. Por otro lado, en el cruzamiento entre el silvestre y el híbrido comercial CL solamente EM fue significativamente superior al control (Figura 1.13).

Figura 1.11: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función del tiempo de estratificación a 5°C y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



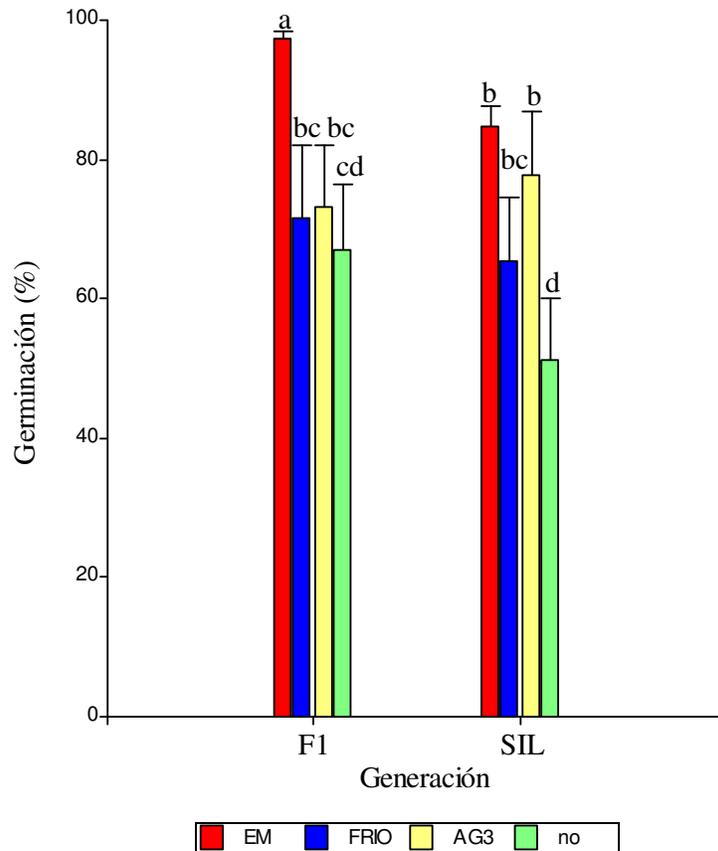
Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 1.12: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función del tiempo de estratificación a 5°C y las generaciones. SIL: *H. annuus* silvestre, F1: cruzamiento silvestre-cultivado.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 1.13: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Las Malvinas (Mendoza) en función de las generaciones y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Río Cuarto (RCU)

La germinación de la accesión de RCU tuvo efectos altamente significativos para las tres fuentes de variación y la interacción tiempo de almacenamiento por acondicionamiento. (Tabla 1.9).

El tiempo de almacenamiento aumento la germinación en las semillas SIL. Luego de 12 meses de estratificación a 5°C, la germinación aumentó en más de tres veces. En las semillas F1 si bien se observó un aumento de la germinación con el envejecimiento de la semilla, este no fue significativo. La EM fue el sistema de acondicionamiento más eficaz en romper la dormición de las semillas. En el caso de las semillas F1, el AG<sub>3</sub>

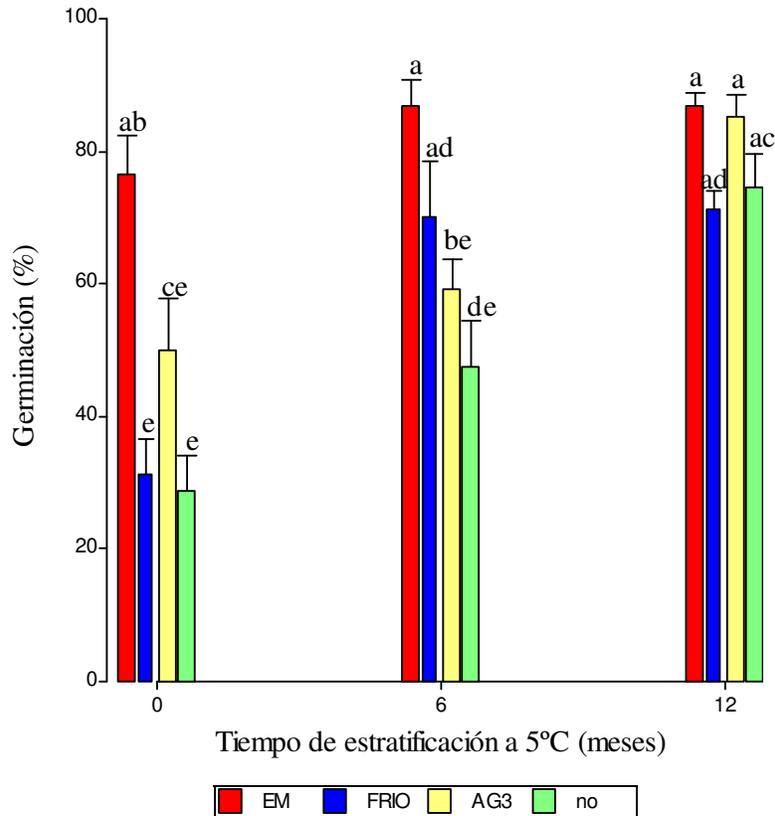
también aumento la germinación mientras que este mismo acondicionamiento no fue efectivo en semillas SIL. (Tabla 1.3 y 1.4).

Tabla 1.9: Análisis de varianza de germinación de una población de *Helianthus annuus* silvestre proveniente de Río Cuarto (Córdoba) y de su cruza con un híbrido comercial CL, bajo cuatro tratamientos y tres momentos de estratificación a 5°C, luego de 15 días a 20°C y fotoperiodo neutro.

F.V.	CM	F	
Modelo	0,40	11,42	**
tiempo(t)	0,96	27,41	**
acondicionamiento(acon)	0,96	27,45	**
generación(g)	1,07	30,33	**
t*acon	0,11	3,15	*
t*g	0,09	2,50	ns
acon*g	0,03	0,93	ns
Error	0,04		

El ANOVA reveló interacción entre el tiempo de escarificación y los tratamientos. Luego de la cosecha de las semillas y tras seis meses a 5°C, el único tratamiento que aumentó la germinación de las semillas fue la EM. Luego de un año de estratificación, la germinación de la población silvestre aumentó y en consecuencia, ninguno de los tratamientos mostró diferencias (Figura 1.14).

Figura 1.14: Germinación (%) de un biotipo de *Helianthus annuus* proveniente de Río Cuarto (Córdoba) en función del tiempo de estratificación a 5°C y los tratamientos. EM: escarificación mecánica, FRIO: una semana a 5 °C, AG3: 1mM de ácido giberélico y no: control.



Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Al comparar entre las poblaciones, la germinación de semillas frescas fue elevada en DIA diferenciándose del resto de las poblaciones que presentaron niveles de germinación menores al 20%. El efecto cruzamiento no fue significativo sin embargo se observó un aumento especialmente en AAL, RCU y BAR (Tabla 1.10)

El envejecimiento de la semilla tuvo un efecto diferencial en las poblaciones. AAL fue la que más respondió aumentando la germinación en un 68%. Por el contrario, DIA fue la que mostró el menor efecto al almacenamiento debido a su elevado porcentaje de germinación inicial. Las demás poblaciones tuvieron comportamientos intermedios.

Entre los sistemas de acondicionamiento, la EM fue la que tuvo mayor efecto en romper la dormición de las poblaciones. Particularmente fue muy efectiva en AAL y LMA. BAR y RCU presentaron valores intermedios mientras que DIA fue la población que menos respondió. Con respecto al AG<sub>3</sub>, las semillas de LMA fueron las que mejor respondieron a este acondicionamiento por el contrario, AAL no mostró respuesta. El frío fue el menos eficaz en promover la germinación, obteniéndose los mejores resultados en semillas de RCU y los menores en AAL y DIA.

Tabla 1.10: Germinación de semilla fresca (G0), diferencial por cruzamiento ( $\Delta F1$ ), diferencial por almacenamiento 12 meses a 5°C ( $\Delta TE$ ) y diferenciales por acondicionamientos ( $\Delta EM$ ,  $\Delta AG_3$ ,  $\Delta FRIO$ ) en cinco poblaciones silvestres de *Helianthus annuus*.

Población	G0	$\Delta F1$	$\Delta TE$	$\Delta EM$	$\Delta AG_3$	$\Delta FRIO$
AAL	15 b	25	68 a	77 a	5 b	2 b
BAR	12 b	18	32 bc	32 cd	15 ab	2 b
DIA	77 a	-4	20 c	13 d	11 ab	12 ab
LMA	15 b	8	43 ac	63 ab	26 a	17 a
RCU	19 b	20	53 ab	46 bc	16 ab	18 a
<b>ANOVA</b>	**	ns	**	**	*	**

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Todas las poblaciones ajustaron al modelo logístico con tres parámetros. El tiempo de germinación del 50% de las semillas (TG50) fue variable entre las poblaciones evaluadas. Aunque para todos los genotipos el tratamiento de escarificación mecánica acortó el TG50 (Tabla 1.11).

Las semillas de AAL y DIA mostraron un comportamiento similar entre sí. El TG50 de las semillas de las poblaciones puras rondó los seis días mientras que el cruzamiento con el híbrido comercial imi-tolerante disminuyó en un día este parámetro. El TG50 de las semillas escarificadas fue de alrededor de dos días y medio.

Las semillas de la población de LMA fueron las que tuvieron el menor período para alcanzar el 50% de germinación y la escarificación mecánica disminuyó en medio día este período. Sin embargo, el cruzamiento con el híbrido comercial CL no afectó la tasa de germinación de las semillas de *H. annuus* silvestre de esta población.

Las semillas de BAR y RCU fueron las que más tardaron en alcanzar el 50% de germinación, con períodos de 9 y 7 días respectivamente. La escarificación mecánica disminuyó el TG50 en más de dos días. Por otro lado, la respuesta al cruzamiento con el cultivar tolerante a imidazolinonas no fue igual para ambos genotipos. En el caso de BAR, el cruzamiento disminuyó este período mientras que las semillas silvestre-cultivado de RCU mantuvieron el TG50 de la población original.

Tabla 1.11: Tiempo de germinación del 50% de las semillas (TG50) de cinco poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* sin escarificar (SIL), escarificada (EM) o cruzada con un híbrido imi-tolerante (F1).

POB	Tratamientos	TG50 (días)	P
AAL	SIL	5,8 c	0,99
	EM	2,3 a	
	F1	4,9 b	
BAR	SIL	8,8 c	0,87
	EM	6,0 a	
	F1	7,5 b	
DIA	SIL	5,7 c	0,99
	EM	2,6 a	
	F1	4,9 b	
LMA	SIL	4,0 b	0,99
	EM	3,5 a	
	F1	4,1 b	
RCU	SIL	6,9 b	0,59
	EM	4,7 a	
	F1	6,6 b	

En la columna de la derecha se encuentra el p-valor de la prueba de ajuste del modelo logístico con tres parámetros.

## DISCUSIÓN

Las semillas de *H. annuus* silvestre respondieron al estímulo lumínico ya que la germinación se duplicó en comparación con las semillas de la misma población colocadas en oscuridad. Sin embargo, el genotipo cultivado no mostró ninguna respuesta ante el estímulo lumínico, germinando de igual manera cuando fueron expuestas o no a la luz. Este tipo de respuesta lumínica también ha sido observada en semillas de *H. bolanderi* y *H. exilis* mostrando más del doble de germinación cuando germinaron bajo rojo que bajo rojo lejano (Olivieri y Jain, 1978) y en semillas de *H. paradoxus* en cuyo caso la germinación pasó del 10% en oscuridad al 40% en luz (Van Auken, 2001). Esta respuesta lumínica en especies sensibles se debe a que la absorción de luz roja convierte el fitocromo inactivo (Pr), que inhibe la germinación, a fitocromo activo (Pfr), que la promueve (Baskin y Baskin, 1998). La conversión de Pr a Pfr promueve la regulación genes que incrementan el nivel de ácido giberélico en la semilla lo que induce la germinación (Toyomasu *et al.*, 1998).

Aunque en esta situación particular, la ausencia de respuesta a la luz se debería a la ausencia de dormición en el girasol cultivado. Milberg *et al.*, (2000) concluyeron que el requerimiento de luz para germinar se vuelve menos importante en semillas de mayor tamaño. Esto explicaría porque las semillas de girasol cultivado, que tienen más del doble de tamaño que la semillas de girasol silvestre (Figura 1.1), no respondieron al estímulo lumínico.

La germinación varió con la temperatura, la población y el cruzamiento silvestre-cultivado. A 15°C, las semillas de *H. annuus* y sus F1 silvestre-cultivado mostraron los mayores porcentajes de germinación. A 10 y 20°C también se lograron buenos porcentajes de germinación aunque inferiores a los de 15°C. Así mismo, a 20°C las F1 tuvieron mayores niveles de germinación que sus parentales silvestres, esta tendencia se observó en todas las temperaturas evaluadas (Figura 1.5). Estos resultados indicarían que las semillas de girasol silvestre y sus respectivas F1, luego de un año de almacenamiento seco a 5°C, aún se encontrarían en dormición condicional ya que sólo obtuvieron buenos niveles de germinación en un estrecho rango de temperaturas. Por otro lado, estudios previos han demostrado que cuando las semillas no tienen dormición

presentan buenos niveles de germinación en un amplio rango de temperatura que va desde los 5 a los 40°C (Gay *et al.*, 1991; Hernández y Paoloni, 1998).

El ensayo de ruptura de la dormición reveló que la dormición disminuyó con el tiempo de almacenamiento seco en frío, que el cruzamiento con el híbrido IMI-tolerante aumentó levemente la germinación de las semillas y que el tratamiento más eficaz en promover la germinación fue la escarificación mecánica. Con respecto a esto, si bien los tratamientos con frío y ácido giberélico aumentaron sutilmente la germinación fueron menos contundentes y su respuesta varió con los genotipos. A su vez, si bien el tratamiento con ácido giberélico también aumentó la germinación, la concentración utilizada produjo plantas etioladas y anormales, este tipo de plántulas también fueron observadas por Chandler y Jan (1985).

La escarificación mecánica no sólo rompió la dormición sino que aumentó la tasa de germinación de las semillas (Tabla 1.11). El proceso de escarificación que removió parte del pericarpio promovió la germinación debido posiblemente a la disminución de los inhibidores presentes en las coberturas maternas (Baskin y Baskin, 1998). Por otro lado, el aumento de la tasa de germinación de las semillas escarificadas fue posiblemente causado por una mayor tasa de absorción de agua (Figura 1.2), lo que permitiría que los procesos que llevan a la germinación se desencadenen antes. La escarificación física posiblemente sea un mecanismo que modula la dinámica poblacional en los agroecosistemas. Ello podría ser debido a la fricción de la arena sobre las cipselas impulsada por el viento o por disturbio antrópico del suelo, factor que ha resultado ser promotor de la emergencia de plántulas de *H. annuus* (Moody-Weis y Alexander, 2007).

En regiones templadas, las semillas de las especies primavero-estivales que germinan en primavera o en verano requieren exposición a las bajas temperaturas del invierno para salir de la dormición (Baskin y Baskin, 1998). Esto explica por qué el almacenamiento a bajas temperaturas durante un año aumentó la germinación de las semillas de *H. annuus*. Esta respuesta también ha sido detectada en semillas de *H. paradoxus* almacenadas por más de un año a 4°C (Van Auken, 2001). Estudios recientes demuestran que las bajas temperaturas promueven la regulación positiva y negativa de

genes que participan en la síntesis de las giberelinas y que inducen la germinación (Yamauchi *et al.*, 2004).

En función de estos resultados, el tipo de dormición de semillas de *H. annuus* silvestre sería fisiológica. Estaría regulada por el balance entre el ácido abscísico y el ácido giberélico en el embrión (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008) que aunque no fue evaluado en este trabajo, se comprobaría por la respuesta a la luz y a la estratificación, ambas vinculadas a la síntesis de ácido giberélico. Sin embargo, las semillas mostraron además una restricción a la germinación impuesta por las coberturas maternas. Algunos estudios sugieren que la composición de las coberturas (ej: compuestos fenólicos) las harían menos permeables a la entrada de oxígeno y/o a la salida de inhibidores como el ácido abscísico (Corbineau *et al.*, 1989; Debeaujon *et al.*, 2000; Cousens *et al.*, 2009).

El cruzamiento con un híbrido de girasol domesticado CL aumentó levemente la germinación especialmente en AAL, BAR y RCU. Estos resultados concuerdan con los hallados por Snow *et al.* (1998) y Mercer *et al.* (2006a) quienes hallaron que la germinación de los híbridos silvestre por cultivado (tres poblaciones, tres materiales domésticos) aumentaba con respecto a las poblaciones silvestres puras. A pesar de haber demostrado un incremento en la germinación debido al cruzamiento con materiales domesticados, los autores citados previamente concluyen que el efecto del fondo genético silvestre y de los materiales cultivados es variable. Esta conclusión también concuerda con estos resultados ya que entre las poblaciones argentinas evaluadas se encontró respuesta diferencial al tiempo de almacenamiento y a los sistemas de acondicionamiento (Tabla 1.10).

El efecto genotipo (fondo genético silvestre) no sólo se comprobó en el comportamiento diferencial al almacenamiento en seco a 5°C y al acondicionamiento sino también en la tasa de germinación, encontrándose cruzamientos como la F1 de AAL, BAR y DIA que disminuyeron el TG50 de las semillas mientras que las F1 de LMA y RCU no variaron con respecto a la población silvestre original (Tabla 1.11).

Si bien el cruzamiento con el híbrido cultivado aumentó ligeramente la germinación, la ruptura de dormición por hibridación no fue completa ya que, luego de seis meses de

almacenaje seco en frío, la germinación de las cinco F1 alcanzó sólo el 56% (Tabla 1.3), encontrándose una gran variación entre las mismas. En la progenie con DIA y LMA sólo el 25% de las semillas se mantuvo dormida mientras que en el otro extremo, cuando el parental femenino fue BAR, el 75% de las semillas permaneció dormida. Por lo tanto, en mayor o menor medida una fracción de las semillas de la progenie silvestre-cultivado formarían parte del banco de semillas del suelo lo que incrementaría las probabilidades que en las próximas generaciones prosiga la introgresión de genes del girasol cultivado en las poblaciones silvestres.

Las semillas provenientes de cruzamientos silvestre-cultivado serán predominantemente dispersadas en áreas disturbadas (ej: agroecosistemas) donde se encuentren ambos parentales. En tales impredecibles ambientes, la uniformidad en la germinación puede reducir la habilidad de persistir de esos híbridos. Por lo tanto, el comportamiento de las semillas silvestre-cultivo que más se parezca al de sus parentales silvestres será el que más posibilidades de producir plantas híbridas que sobrevivan y se retrocruzen con plantas de la población silvestre (Landbo y Jørgensen, 1997).

Cuando la relación germinación silvestre/germinación híbridos es menor a 1 es posible que un número desproporcionado de híbridos silvestre-cultivado crezcan dentro de una población silvestre debido a la mayor proporción de semillas geminadas. Por el contrario, cuando la relación es mayor a 1, los silvestres predominarán. Por lo tanto, poblaciones silvestres con baja germinación relativa sobre los híbridos corren mayor riesgo de incorporar genes de cultivado (Mercer *et al.*, 2006a). Así por ejemplo si todas las semillas activas de SIL y F1 germinaran en la primavera, AAL, LMA, RCU serían las poblaciones con el mayor riesgo de incorporar la tolerancia a imidazolinonas. Si en cambio, condiciones ambientales benignas del otoño permiten la germinación de las semillas de SIL y F1 activas luego de la cosecha, estas serían eliminadas por las bajas temperaturas invernales por lo que sólo emergerían aquellas semillas que despertaron luego de período invernal. Bajo este nuevo escenario LMA parece ser la única población con riesgo de incorporar la tolerancia a imidazolinonas (Tabla 1.12).

Tabla 1.12: Proporción germinación SIL: F1 bajos dos escenarios extremos. Escenario 1: todas las semillas activas germinan en la primavera luego de estar seis meses invernando (G6). Escenario 2: sólo germina la proporción de semillas que despierta luego del período invernal (G6-G0), las que germinaron luego de la cosecha (G0) son aniquiladas en el invierno.

Población	G6	G6-G0	Escenario 1	Escenario 2
AAL	43	28	0,44	0,65
AALF1	55	15	0,56	0,35
BAR	36	24	0,59	1,00
BARF1	25	0	0,41	0,00
DIA	97	20	0,56	0,95
DIAF1	75	1	0,44	0,05
LMA	59	44	0,44	0,46
LMAF1	75	52	0,56	0,54
RCU	46	27	0,47	0,69
RCUF1	51	12	0,53	0,31

## **Capítulo 2 : SENSIBILIDAD A SULFONILUREAS E IMIDAZOLINONAS DE POBLACIONES DE *Helianthus annuus* Y SUS HIBRIDOS CON UN GIRASOL CL**

Los herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) – imidazolinonas (IMI), sulfonilureas (SU), triazolopirimidinas (TP), pirimidiltiobenzoatos (PTB) y sulfonil amino carbonil triazolinonas (SCT)- son muy utilizados en el mundo debido a su amplio espectro de control de malezas, baja toxicidad en mamíferos, alta selectividad y bajas dosis de aplicación (Mallory-Smith y Retzinger Jr., 2003, Arregui y Puricelli, 2008).

AHAS es una enzima situada en el cloroplasto que participa en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina. Esta enzima está compuesta por dos subunidades, una mayor que es catalítica y otra menor que es regulatoria. El sitio activo de la enzima se localiza en la interfase entre las dos subunidades, cercano al sitio propuesto de unión de los herbicidas (Pang *et al.*, 2002). Las plantas susceptibles a este grupo de herbicidas rápidamente cesan su crecimiento por inhibición de la división celular en las etapas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> y posteriormente llega la muerte por inanición. El agregado exógeno de valina e isoleucina revierte la inhibición mitótica (Rost y Reynolds, 1985). La sustitución de un aminoácido en el sitio propuesto de unión del herbicida resulta en el incremento de la resistencia de la AHAS a imidazolinonas mientras que otras sustituciones incrementan la resistencia de la enzima a sulfonilureas. Analizando la estructura de la AHAS se sugiere que estos herbicidas interferirían en la acción de la enzima, uniéndose al canal de acceso del sustrato (Pang *et al.*, 2002; Duggleby *et al.*, 2003).

Desde la aparición del primer herbicida inhibidor de la AHAS, clorsulfurón, en 1982 hasta la actualidad no sólo ha aumentado su utilización sino también la aparición de malezas tolerantes. Es así que el número de malezas tolerantes a este grupo de herbicidas supera las 100 especies vegetales en todo el mundo, siendo los herbicidas con mayor número y con la mayor tasa de crecimiento de especies tolerantes (Heap, 2010).

El descubrimiento de especies tolerantes a inhibidores de la AHAS ha llevado al desarrollo y comercialización de cultivos tolerantes a imidazolinonas. Esta tolerancia ha sido incorporada a través de métodos convencionales de mejoramiento y se conoce con el nombre de tecnología Clearfield® (CL). En la actualidad se emplean maíz, colza, arroz, trigo y girasol tolerantes a imidazolinonas (Tan *et al.*, 2005), todos excepto la colza comercializados en nuestro país (BASF 2010).

El hallazgo de una población de *Helianthus annuus* tolerante a imidazolinonas en un lote en Kansas, luego de siete años de tratamiento con imazetapir (Al-Khatib *et al.*, 1998) llevó al desarrollo de girasoles CL que comenzaron a comercializarse en Argentina en la campaña 2003 (Zollinger, 2003). Los híbridos CL se comercializan junto a un herbicida de amplio espectro cuyo principio activo es imazapir y se lo conoce con el nombre de Clearsol® (BASF, 2010).

La existencia de poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en la región central de nuestro país y la posibilidad de originar híbridos fértiles con el girasol domesticado (Ureta *et al.*, 2008) genera un escenario en el que es probable la aparición de híbridos silvestre-cultivado tolerantes a imidazolinonas.

Un biotipo que posee resistencia cruzada es aquella maleza o cultivo que ha evolucionado un mecanismo o mecanismos de resistencia a un herbicida y a su vez le permite resistir otros herbicidas. Esta resistencia puede ocurrir en la misma o entre familias de herbicidas y con el mismo o diferente sitio de acción. Por ejemplo, luego del uso extensivo del herbicida A en un lote, se seleccionó un biotipo que a su vez fue resistente a un herbicida B, que nunca había sido aplicado en este lote (Gunsolus, 2002).

Hay vasta información sobre resistencia cruzada en especies tolerantes a herbicidas inhibidores de AHAS. Por ejemplo, un biotipo de *Stelaria media* que fue colectado de un lote luego de cuatro años consecutivos de aplicación de SU demostró tener resistencia cruzada a un herbicida de la familia de las TP (Hall y Devine, 1990). También, cinco biotipos de *Xanthium strumarium* fueron colectados en lotes que habían recibido aplicaciones repetidas de IMI, entre los cuales se detectaron dos biotipos que mostraron resistencia cruzada a herbicidas de las familias de las IMI, SU y TP, dos tolerantes a herbicidas de la familia de las IMI y uno tolerante a imazetapir (Sprague *et*

*al.*, 1997). Un biotipo de *Amaranthus hybridus* colectado en un lote con historia de uso repetido de herbicidas inhibidores de AHAS, demostró una elevada tolerancia a herbicidas de las familias de las SU, IMI, TP y PTB (Whaley *et al.*, 2007). En otro ejemplo, tres biotipos de *Cyperus difformis* que no fueron controlados con bensulfuron (SU) mostraron respuestas variables a herbicidas de la familia de las SU e IMI. Uno de ellos manifestó resistencia cruzada a otras dos SU y a una IMI, otro a una SU y a una IMI y el tercero sólo fue moderadamente tolerante a bensulfurón (Merotto *et al.*, 2009).

En girasol, la mutación introducida que proviene de la población de *H. annuus* tolerante encontrada en Kansas (Al-Khatib *et al.*, 1998) no sólo es conocida por su tolerancia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas sino que también ha mostrado resistencia cruzada a herbicidas SU (clorimurón, tifensulfurón) y TP (cloransulam). En esta población Baumgartner *et al.*, (1999) encontró que el nivel de tolerancia decreció de la siguiente manera: imazamox > tifensulfurón > clorimurón > cloransulam. Otros ejemplos de resistencia cruzada en girasol son las poblaciones de *H. annuus* encontradas en South Dakota y Iowa que resultaron poseer tolerancia a imazetapir y a clorimuron (White *et al.*, 2002; Zelaya y Owen, 2004).

El cruzamiento entre *H. annuus* silvestre y el girasol domesticado CL no sólo podría generar tolerancia a imazapir en las progenies silvestre-cultivado sino que estas podrían tener resistencia cruzada a herbicidas de la misma familia o de familias que actúan sobre el mismo sitio de acción (ej: sulfonilureas).

En estudios de selectividad de herbicidas es común realizar bioensayos para diferentes especies y/o principios activos a través de curvas de dosis-respuesta. Para analizar esta información, se asume que la respuesta sigue una curva no lineal especificada por la función  $f$ , que es conocida a través de sus parámetros, los que pueden ser diferentes para diferentes curvas. Los modelos para curvas sigmoideas de dosis-respuesta más comúnmente usados son logístico y Gompertz (Ritz y Streibig, 2005).

La función logística de cuatro parámetros está definida por la ecuación 1:

$$f [x, (b, c, d, e)] = c + \{d - c / 1 + \exp [b(\log(x) - \log(e))]\}$$

Donde el parámetro **e** es también conocido como ED50 y es la dosis efectiva de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco o seco de una planta con respecto al peso de la misma sin tratar con el herbicida, o que controla al 50% de los individuos (DL50). Los parámetros **d** y **c** son el límite (peso) superior e inferior respectivamente. El parámetro **b** es la pendiente relativa alrededor de **e**. La función logística es simétrica alrededor de **e**. Cuando el límite inferior tiende a cero, la función pasa a tener tres parámetros (**b**, **d** y **e**).

La función logística de tres parámetros está definida por la ecuación 2:

$$f [x, (b, d, e)] = d / 1 + \exp [b(\log(x) - \log(e))]$$

La función Gompertz de cuatro parámetros está definida por la ecuación 3:

$$f [x, (b, c, d, e)] = c + (d - c) \exp\{- \exp[b(\log(x) - e)]\}$$

Donde los parámetros **c** y **d** son el límite inferior y superior respectivamente, como en el modelo logístico. El parámetro **b** es la pendiente relativa alrededor de **e** y este último es el logaritmo del punto de inflexión. El modelo Gompertz no es simétrico. Al igual que en el modelo anterior, si el límite inferior tiende a cero, la función pasa a tener tres parámetros (**b**, **d** y **e**).

La función Gompertz de tres parámetros está definida por la ecuación 4:

$$f [x, (b, d, e)] = d \exp\{- \exp[b(\log(x) - e)]\}$$

Figura 2.1: Curvas de dosis-respuesta simétricas y asimétricas. La figura de la izquierda corresponde a una curva de dosis-respuesta simétrica (ecuación 1 y 2). La figura de la derecha corresponde a una curva de dosis-respuesta asimétrica (ecuación 3 y 4). Origen: Knezevic *et al.*, (2007).



Estos bioensayos de dosis respuesta pueden ser analizados utilizando la aplicación *drc* del paquete estadístico R, que se encuentra disponible en [www.R-project.org](http://www.R-project.org) (Ritz y Streibig 2005; Knezevic *et al.*, 2007).

La hipótesis es que la mutación IMI es transferida a plantas silvestres mediante flujo génico desde el cultivo y se expresa como una tolerancia a los herbicidas tipo imidazolinonas (imazapir). Por ello, el objetivo fue realizar cruzamientos controlados entre plantas silvestres y cultivares Clearfield® tolerantes a ese herbicida y estudiar la sensibilidad al herbicida de los híbridos resultantes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los experimentos fueron conducidos en invernáculo (Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur).

### **Experimento I**

Para evaluar la respuesta a imazapir (Clearsol®) se realizaron cruzamientos controlados entre poblaciones de girasol silvestre y un híbrido comercial tolerante a imidazolinonas.

En el primer experimento (2008), el germoplasma silvestre estuvo constituido por plantas de cinco poblaciones silvestres representativas de *H. annuus* colectadas en la región central argentina. Ellos fueron Rio Cuarto (RCU); Colonia Barón (BAR); Adolfo Alsina (AAL); Diamante (DIA y Las Malvinas (LMA). El híbrido comercial utilizado fue el DK3880 CL®.

La semilla de cada accesión fue regenerada mediante polinización controlada de capítulos de 20-30 individuos que fueron protegidos de polen externo utilizando bolsas de papel colocadas en el estado R4 (Schneiter y Miller, 1981). Para obtener semilla F1 se realizaron cruzamientos controlados entre las plantas silvestres y el cultivo. En el estadio R4 se procedió a tapan los capítulos ( $n > 20$  por población) y a partir de R5 se procedió a emasculación y a polinizar diariamente con el híbrido CL hasta finalizar la floración (R6).

Previo a la siembra, las semillas se colocaron en bandejas de plástico, entre papel secante, en heladera a 5° C por un período de una semana (ISTA 2004). Se utilizaron bandejas de plástico para cría de plantines de 28 x 54 cm con 200 celdas. La siembra se realizó utilizando sustrato a base de turba (GROW MIX®), disponiendo dos semillas por celda. Con el objetivo de obtener una sola planta por celda, se eliminaron plántulas en los casos en los que hubiese dos. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernáculo hasta la finalización de los ensayos.

En el estadio de 2-4 hojas se procedió a aplicar el herbicida. La aplicación se realizó con una mochila aspersora de presión manual provista con una pastilla tipo abanico plano 8001 utilizando un caudal de 175 l ha<sup>-1</sup>. Luego de cada aplicación, se excluyó el riego durante 24 h para evitar el lavado del principio activo. Se utilizaron cuatro dosis del herbicida imazapir (Clearsol®, 80g p.a. ha<sup>-1</sup>): 0,00X, 0,50X, 2,00X y 8,00X. La velocidad de trabajo fue 0,7 m s<sup>-1</sup>, se consideraron 0,6 m de ancho de labor y se utilizó como tensiactivo Canoplus® en una concentración de 0,05%.

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones en el que cada biotipo estuvo representado por unidades experimentales con 6-8 plantas. Tres semanas después de la aplicación se determinó el efecto del herbicida a través de una escala visual de fitotoxicidad que varió de 0 = sin daño, 1 = 25% de daño, 2 = 50% de daño, 3 = 75% de daño y 4 = muerte del ápice. Los datos se expresaron como porcentaje de supervivencia (Al-Khatib *et al.*, 2000). Para la determinación de la acumulación de materia seca, las plantas fueron separadas en parte aérea y raíz. Previo lavado manual de las raíces ambas fracciones fueron colocadas en estufa a 60°C durante una semana hasta peso constante y posteriormente pesadas. La cuantificación visual del daño fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos de materia seca fueron analizados mediante ANOVA doble. Las fuentes de variación fueron: biotipos y dosis.

## **Experimento II**

Debido a la limitada cantidad de dosis ensayadas en el experimento I, la información obtenida no pudo ajustarse a un modelo de regresión no lineal. Por esto, decidió realizarse este nuevo ensayo.

En el segundo experimento (2009), el germoplasma silvestre estuvo representado por dos poblaciones silvestres de *H. annuus*, DIA y LMA. El híbrido comercial utilizado fue el DK3880 CL®.

Se utilizó la misma metodología de obtención de las semillas de las poblaciones silvestres y de sus progenies con el híbrido IMI-tolerante. Para la cría de plantines se utilizaron bandejas de plástico de 24 x 54 cm con 128 celdas.

Se utilizaron ocho dosis de herbicida: 0,00X, 0,06X, 0,13X, 0,50X, 1,00X, 2,00X, 8,00X y 16,00X. La velocidad de trabajo, ancho de labor y la concentración del tensioactivo fue igual que en el experimento I. La aplicación se realizó con una mochila de presión constante operada a 21 kg cm<sup>-2</sup> utilizando una pastilla tipo abanico plano 8001 y un caudal de 105 l ha<sup>-1</sup>. Bajo las condiciones de aplicación se aplicaron 147 gotas cm<sup>2</sup>, predominando un diámetro inferior a 150 micrones. Luego de cada aplicación, se excluyó el riego durante 24 h para evitar el lavado del principio activo.

El diseño estadístico y el análisis del efecto del herbicida siguieron la misma metodología descrita previamente. Para este experimento se determinaron las curvas de dosis-respuesta utilizando el paquete *drc* (dosis response curves) del programa estadístico R2.9.0 (2009).

### **Experimento III**

Para evaluar la respuesta cruzada a herbicidas de la familia de las sulfonilureas e imidazolinonas se realizaron cruzamientos entre un híbrido comercial tolerante a imidazolinonas y poblaciones silvestres de girasol.

El germoplasma silvestre utilizado estuvo constituido por dos poblaciones silvestres AAL y DIA. El híbrido comercial utilizado fue el DK3880 CL®.

Se realizaron cruzamientos controlados entre *H. annuus* y el híbrido comercial CL, utilizado como parental materno. Para ello, este último fue emasculado y polinizado diariamente, utilizando polen de plantas silvestres, utilizando la misma metodología descrita en el experimento II. La cría de plantines también fue según lo descrito en el experimento II.

En estadio de 2-4 hojas se procedió a la aplicación de los herbicidas seleccionados (Tabla 2.1) utilizando la mitad (0,5X) y el doble de la dosis comercial (2X). Las condiciones de aplicación fueron las descritas para el experimento II.

Tabla 2.1: Herbicidas aplicados en poblaciones silvestres de *H. annuus*, el híbrido comercial DK3880CL y cruzamientos silvestre-cultivado. p.a: principio activo, NC: nombre comercial, 1,0X: dosis recomendada (CASAFE, 2007) y CULTIVOS en los que se utilizan.

Herbicida	p.a nomenclatura química	NC	p.a (g/ha)			CULTIVOS
			0,5X	1,0X	2,0X	
<b>Sulfonilureas</b>						
Clorimuron Etil	Etil[(((4-cloro-6-metoxipirimidin-2-il)amino)carbonil)amino]sulfonil] benzoato	<i>BACKUP</i>	5,0	10,0	20,0	pasturas, soja
Iodosulfuron Metil Sodio	Metil 4 iodo 2[3(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) ureidosulfurfonil]benzoato		1,5	3,0	6,0	trigo
Metsulfuron Metil	Metil 2-(((4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)amino)carbonil)amino]sulfonil] benzoato	<i>ESCORT</i>	2,4	4,8	9,6	cebada, trigo
Prosulfuron	N-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)-amino]carbonil]-2-(3,3,3-trifluoropropil)-benceno sulfonamida	<i>PEAK 75 WG</i>	11,3	22,5	45,0	maíz, sorgo, trigo
Triasulfuron	3-(6-metoxi-4-metil-1,3,5-triazina-2-il)amino)-1-(2-(2-cloroetoxifenilsulfonil)-urea	<i>LOGRAN</i>	3,8	7,5	15,0	trigo
<b>Imidazolinonas</b>						
Imazapir	Acido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)nicotínico	<i>CLEAR SOL</i>	40,0	80,0	160,0	girasol CL, caña de azúcar
Imazetapir	Acido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)nicotínico	<i>PIVOT</i>	50,0	100,0	200,0	alfalfa, arveja, maíz CL, maní, soja

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y unidades experimentales de 6-8 plantas. Tres semanas después de la aplicación se determinó el efecto del herbicida utilizando una escala visual de fitotoxicidad que varió de 0 = sin daño a 4 = muerte del ápice, los datos recolectados se expresaron como porcentaje de supervivencia. Las partes aéreas de las plantas fueron colocadas en estufa a 60°C durante una semana y pesadas para calcular la materia seca de las mismas. Los datos de materia seca fueron analizados mediante ANOVA doble. Las fuentes de variación

fueron: biotipos y dosis entre los herbicidas. Dado que no existió interacción entre las poblaciones silvestres ni los cruzamientos cultivo-silvestre se formaron tres grupos: poblaciones silvestres (SIL), híbrido comercial CL (IMI) y los cruzamientos cultivo-silvestre (F1).

Los resultados fueron analizados con los paquetes estadísticos Infostat (2008) y R2.9.0 (2009).

## RESULTADOS

### Experimento I

Se encontraron diferencias altamente significativas entre biotipos y dosis aunque no se detectó interacción entre ambos para las tres variables consideradas (Tabla 2.2). Por lo tanto, se separó la información entre biotipos: cinco poblaciones silvestres y cinco progenies silvestre-cultivo. Al realizar nuevamente el ANOVA no se detectó interacción entre las poblaciones silvestres y las dosis utilizadas, lo mismo sucedió cuando se analizaron las F1. Por esto, se decidió agrupar la información por biotipo: poblaciones silvestres (SIL) y progenie silvestre-cultivado (F1).

Tabla 2.2: Análisis de varianza de la biomasa aérea, radicular y relación planta/raíz de *Helianthus annuus* silvestre (SIL) y sus cruza con un híbrido CL (F1) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®).

FV	Biomasa aérea (mg)			Biomasa radicular (mg)			Relación planta/raíz		
	CM	F		CM	F		CM	F	
Modelo	5729,1	5,5	**	2590,6	12,0	**	11,8	7,0	**
biotipos (g)	23845,0	22,7	**	9228,0	42,8	**	25,4	15,0	**
dosis (d)	4133,7	3,9	**	2481,4	11,5	**	15,1	8,9	**
g*d	1285,9	1,2	ns	487,4	2,3	ns	3,9	2,3	ns
Error	1049,9			215,5			1,7		

Los síntomas causados por el herbicida sobre las plantas fueron dependientes del biotipo evaluado y de la dosis aplicada. Los materiales más susceptibles, a pocos días de la aplicación del herbicida, comenzaron a mostrar amarillamiento en hojas jóvenes y ápice de las plantas. Con el correr de los días estos síntomas se agravaron, manifestándose necrosis en hojas y ápices, con la consecuente muerte de las plantas. Por

el contrario, los materiales más tolerantes mostraron síntomas solamente en las dosis más elevadas. Entre estos dos extremos se encontraron situaciones intermedias, plantas con daño severo en hojas superiores pero con el ápice sano, o plantas con necrosis parcial de las hojas superiores y ápice sano, o plantas con manchas necróticas en las hojas superiores y ápice sano.

Las plantas silvestres fueron afectadas con la dosis más baja, sobreviviendo menos del 35% con la mitad de la dosis comercial del herbicida. Con las dosis elevadas el control fue prácticamente total. Por el contrario, los cruzamientos silvestre-CL aumentaron la tolerancia a imazapir y fueron solo levemente afectados aún con el doble de la dosis comercial, aunque no se diferenciaron del testigo. Asimismo, la dosis más elevada sólo causó un 48% de mortandad de las plantas F1, diferenciándose significativamente del testigo y de las dosis más bajas que presentaron escasa mortandad (Tabla 2.3).

La biomasa por planta de los biotipos silvestres fue afectada con la dosis más baja (0,5X) que se diferenció significativamente del testigo. Aunque en términos absolutos la biomasa por planta siguió disminuyendo con el incremento de la dosis no se apreciaron diferencias estadísticas con la mitad de la dosis comercial. Contrariamente, la biomasa de las plantas F1 fue poco afectada con el aumento de la dosis del herbicida. Si bien la dosis más alta disminuyó el peso por planta, este efecto no fue estadísticamente significativo.

La biomasa de raíz fue más sensible a la aplicación del herbicida. En las plantas silvestres, el peso de la raíz disminuyó gradualmente con el aumento de la dosis. El menor peso se registró con la dosis más alta. La dosis más baja fue significativamente inferior al testigo. Las plantas F1 mostraron un comportamiento diferente. La biomasa de sus raíces en dosis 0,5X y 2X no se diferenció significativamente del testigo. La relación entre la biomasa de la planta y de la raíz también fue alterada por la aplicación de imazapir. Tanto los biotipos silvestres como sus respectivas F1 presentaron una relación planta/raíz cercana a dos, sin herbicida. Sin embargo, en las plantas silvestres la relación aumentó con la aplicación del herbicida. En las plantas F1, solamente la dosis más elevada se diferenció significativamente del testigo.

Tabla 2.3: Supervivencia, biomasa por planta y de raíz, y relación planta/raíz (media  $\pm$  error estándar) en plantas silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y su cruza con un híbrido comercial CL (F1) bajo cuatro dosis de imazapir.

Biotipo	Dosis			
	0	0,5X	2X	8X
Supervivencia (%)				
SIL	98,0 $\pm$ 1,4 <b>a</b>	33,0 $\pm$ 4,3 <b>b</b>	4,0 $\pm$ 1,4 <b>c</b>	1,0 $\pm$ 0,4 <b>c</b>
F1	100,0 $\pm$ 0,0 <b>a</b>	94,0 $\pm$ 2,2 <b>a</b>	92,0 $\pm$ 3,2 <b>a</b>	52,0 $\pm$ 5,2 <b>b</b>
Biomasa por planta (mg)				
SIL	81,2 $\pm$ 8,6 <b>a</b>	60,0 $\pm$ 6,6 <b>b</b>	54,8 $\pm$ 6,6 <b>b</b>	46,9 $\pm$ 6,5 <b>b</b>
F1	95,4 $\pm$ 7,0 <b>a</b>	97,7 $\pm$ 5,4 <b>a</b>	93,5 $\pm$ 7,2 <b>a</b>	77,3 $\pm$ 5,2 <b>a</b>
Biomasa por raíz (mg)				
SIL	36,8 $\pm$ 3,4 <b>c</b>	22,4 $\pm$ 2,6 <b>b</b>	18,0 $\pm$ 3,1 <b>ab</b>	12,1 $\pm$ 1,8 <b>a</b>
F1	45,8 $\pm$ 3,0 <b>b</b>	47,4 $\pm$ 3,2 <b>b</b>	38,0 $\pm$ 3,7 <b>ab</b>	31,1 $\pm$ 2,8 <b>a</b>
Relación planta/raíz				
SIL	2,2 $\pm$ 0,1 <b>a</b>	2,8 $\pm$ 0,2 <b>ab</b>	3,3 $\pm$ 0,4 <b>bc</b>	4,2 $\pm$ 0,7 <b>c</b>
F1	2,2 $\pm$ 0,1 <b>a</b>	2,1 $\pm$ 0,1 <b>a</b>	2,8 $\pm$ 0,2 <b>ab</b>	2,9 $\pm$ 0,3 <b>b</b>

Letras distintas indican diferencias según las pruebas de Kruskal-Wallis y Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **Experimento II**

Dado que se encontraron diferencias altamente significativas entre biotipos, dosis y la interacción entre ambos, para las tres variables consideradas (Tabla 2.4) se analizó la información entre biotipos: dos poblaciones silvestres, dos progenies silvestre-cultivo y el híbrido comercial. Al realizar nuevamente el ANOVA no se detectó interacción entre las poblaciones silvestres y las dosis utilizadas, lo mismo sucedió cuando se analizaron las plantas F1. Por esto, se agrupó la información por biotipo: poblaciones de *H. annuus* silvestre (SIL), híbrido comercial CL, progenies silvestre-cultivado (F1).

Tabla 2.4: Análisis de varianza de la biomasa aérea, radicular y relación planta/raíz de *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL y las progenies silvestre-cultivado (F1) en función a dosis crecientes de imazapir (Clearsol®).

FV	Biomasa aérea (mg)			Biomasa radicular (mg)			Relación planta/raíz		
	CM	F	**	CM	F	**	CM	F	**
Modelo	102042,3	58,6	**	14317,7	62	**	27,1	24	**
biotipos (g)	799750,5	459,0	**	100357,7	433	**	44,5	40	**
dosis (d)	82840,8	47,5	**	15634,0	67	**	32,4	29	**
g*d	11970,5	6,9	**	1368,1	5,9	**	21,9	20	**
Error	1742,6			231,9			1,1		

El aumento en el número de dosis evaluadas posibilitó la construcción de una curva de dosis-respuesta para cada biotipo, híbrido comercial CL, poblaciones silvestres (SIL) y sus respectivas cruza (F1). En todos los casos, la información obtenida en el experimento mostró un mejor ajuste con el modelo de regresión no lineal logístico, por lo que se eligió trabajar con el mismo.

La evaluación de la fitotoxicidad a través de la escala utilizada permitió construir una curva de dosis-respuesta para cada biotipo cuyos parámetros fueron significativamente diferentes a cero. Como la supervivencia de los biotipos tendió a cero a medida que aumentaba la dosis, el modelo que ajustó con los datos fue el logístico con tres parámetros donde c (límite inferior de la curva) es cero. La prueba ANOVA de falta de ajuste no fue significativa lo que indica que el modelo logístico con tres parámetros proporcionó una buena descripción de los datos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de supervivencia en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para dos biotipos evaluados: *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).

Genotipo	Parámetros	valor estimado	p-valor
SIL	$b_{sil}$	3,9	**
	$d_{sil}$	100,0	**
	$e_{sil}$	$5,0 \times 10^{-2}$	**
F1	$b_{F1}$	4,5	**
	$d_{F1}$	99,4	**
	$e_{F1}$	3,2	**
IMI	$b_{imi}$	3,8	**
	$d_{imi}$	100,0	**
	$e_{imi}$	6,8	**
<sup>1</sup> ANOVA-prueba de falta de ajuste			
		F-valor	p-valor
Modelo			
DRC		0,88	0,60

<sup>1</sup>ANOVA para probar el ajuste a un modelo logístico con tres parámetros.

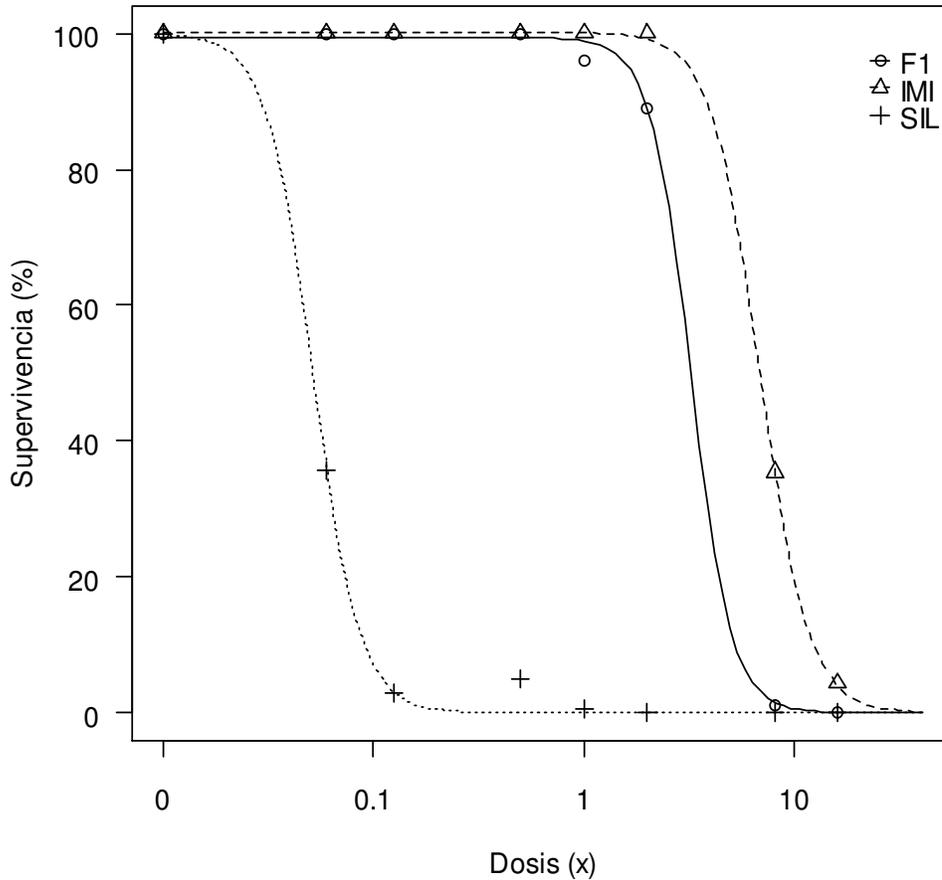
Las poblaciones silvestres fueron las más afectadas por el herbicida, manifestando una dosis letal 50 (DL50=e) de 0,05 veces la dosis comercial de Clearsol®, la cual fue 64 y 136 veces menor que las dosis que controlaron el 50% de las plantas F1 y del híbrido CL, respectivamente. El híbrido IMI-tolerante mostró el mayor nivel de tolerancia mientras que las plantas F1 mostraron un comportamiento intermedio. La DL50 del híbrido fue más de dos veces superior a la de F1. El parámetro b de las tres curvas fue similar, lo que indica que la pendiente alrededor de e fue similar para los tres biotipos y que la disminución de la supervivencia de las plantas tuvo tasas similares para los biotipos evaluados (Tabla 2.5; Figura 2.2).

Con respecto a la biomasa aérea, todos los parámetros fueron significativamente diferentes de cero. La prueba de falta de ajuste no fue significativa lo que indica que el modelo logístico con cuatro parámetros proporcionó una buena descripción de los datos (Tabla 2.6).

Los parámetros entre los biotipos fueron variables. Si bien la biomasa aérea máxima (d) entre las plantas silvestres y sus respectivas F1 fue similar, la biomasa aérea mínima (c) de estas últimas fue un 74% superior que en los biotipos silvestres. Por otro lado, el

híbrido comercial presentó una biomasa aérea máxima y mínima ampliamente superior a las plantas silvestres y F1, indicando que las plantas eran de mayor tamaño para el mismo estadio fenológico.

Figura 2.2: Supervivencia (%) de plantas en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para: *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).



Las curvas representan el modelo logístico con tres parámetros ( $Y_{SIL} (%) = 100,0 / (1 + (x/5,0 * 10^{-2})^{3,9})$ ;  $Y_{F1} (%) = 99,4 / (1 + (x/3,2)^{4,5})$ ;  $Y_{IMI} (%) = 100,0 / (1 + (x/6,8)^{3,8})$ ).

El parámetro e o ED50 fue mínimo para los biotipos silvestres, solo 0,2X de la dosis comercial disminuyó al 50% la biomasa de estos individuos. Por el contrario, las F1 y el híbrido comercial fueron más tolerantes. Para reducir al 50% la biomasa aérea de las F1 y de IMI se necesitaron dosis 11 y 26,5 veces superiores a la requerida para SIL. A su vez, el híbrido comercial fue más 2,4 veces más tolerante que sus progenies con los biotipos silvestres.

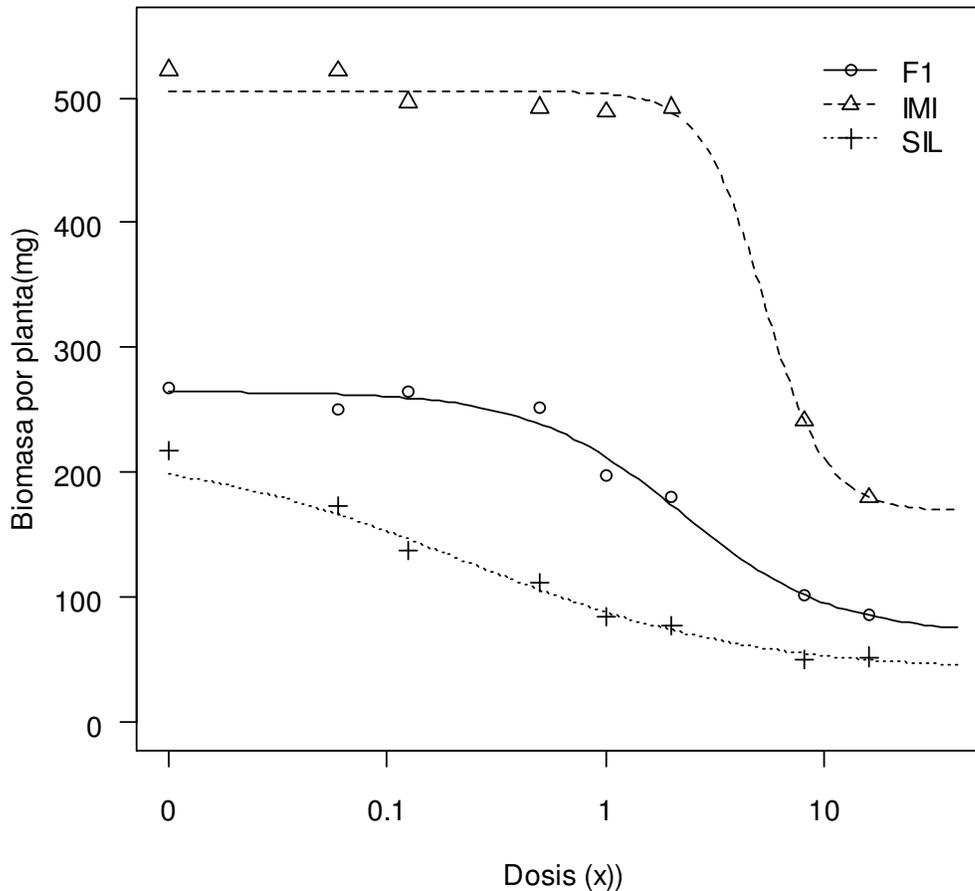
El parámetro b de pendiente relativa alrededor de e fue mínima en SIL y máxima en IMI, lo que muestra que para los biotipos silvestres la disminución de la biomasa fue gradual, mientras que para el híbrido comercial fue más abrupto. Las plantas F1 tuvieron un comportamiento intermedio (Figura 2.3).

Tabla 2.6: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de la biomasa aérea por planta en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).

Genotipo	Parámetros	valor estimado	p-valor
SIL	$b_{sil}$	0,9	**
	$c_{sil}$	45,6	*
	$d_{sil}$	218,1	**
	$e_{sil}$	0,2	*
F1	$b_{F1}$	1,4	*
	$c_{F1}$	94,5	**
	$d_{F1}$	263,1	**
	$e_{F1}$	2,2	**
IMI	$b_{imi}$	3,1	*
	$c_{imi}$	169,1	**
	$d_{imi}$	505,3	**
	$e_{imi}$	5,3	**
<sup>1</sup> ANOVA-prueba de falta de ajuste			
		F-valor	p-valor
Modelo			
DRC		0,38	0,97

<sup>1</sup>ANOVA para probar el ajuste a un modelo logístico con cuatro parámetros.

Figura 2.3: Biomasa aérea (mg) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).



Las curvas representan el modelo logístico con cuatro parámetros ajustado a la información recolectada en el experimento ( $Y_{SIL} \text{ (mg)} = 45,6 + 172,5 / (1 + (x/0,2)^{0,9})$ ;  $Y_{F1} \text{ (mg)} = 94,5 + 168,6 / (1 + (x/2,2)^{1,4})$ ;  $Y_{IMI} \text{ (mg)} = 169,1 + 336,2 / (1 + (x/5,3)^{3,1})$ ).

La biomasa de las raíces no siguió el mismo modelo para los tres biotipos. En las poblaciones silvestres, las dosis más altas llevaron la biomasa radicular prácticamente a cero por lo cual el modelo que ajustó fue logístico con tres parámetros. Por el contrario, para el híbrido IMI-tolerante y las progenies, la biomasa de las raíces no se acercó a cero aun en las dosis más altas por lo que respondieron a un modelo logístico con cuatro parámetros. Las pruebas ANOVA de falta de ajuste fueron no significativas en ambos casos (SIL y F1, IMI), lo que significa que los datos ajustaron a los modelos propuestos (Tabla 2.7).

La ED50 fue mínima para los biotipos silvestres, sólo 0,4X de la dosis comercial disminuyó al 50% la biomasa radicular de esos individuos. Por el contrario, las F1 y el

híbrido comercial fueron más tolerantes. Para reducir al 50% la biomasa aérea de las F1 y de IMI se necesitaron dosis 6,8 y 12,3 veces superiores, respectivamente, a la requerida para SIL. A su vez, el híbrido comercial fue casi dos veces más tolerante que sus progenies con los biotipos silvestres (Tabla 2.7; Figura 2.4).

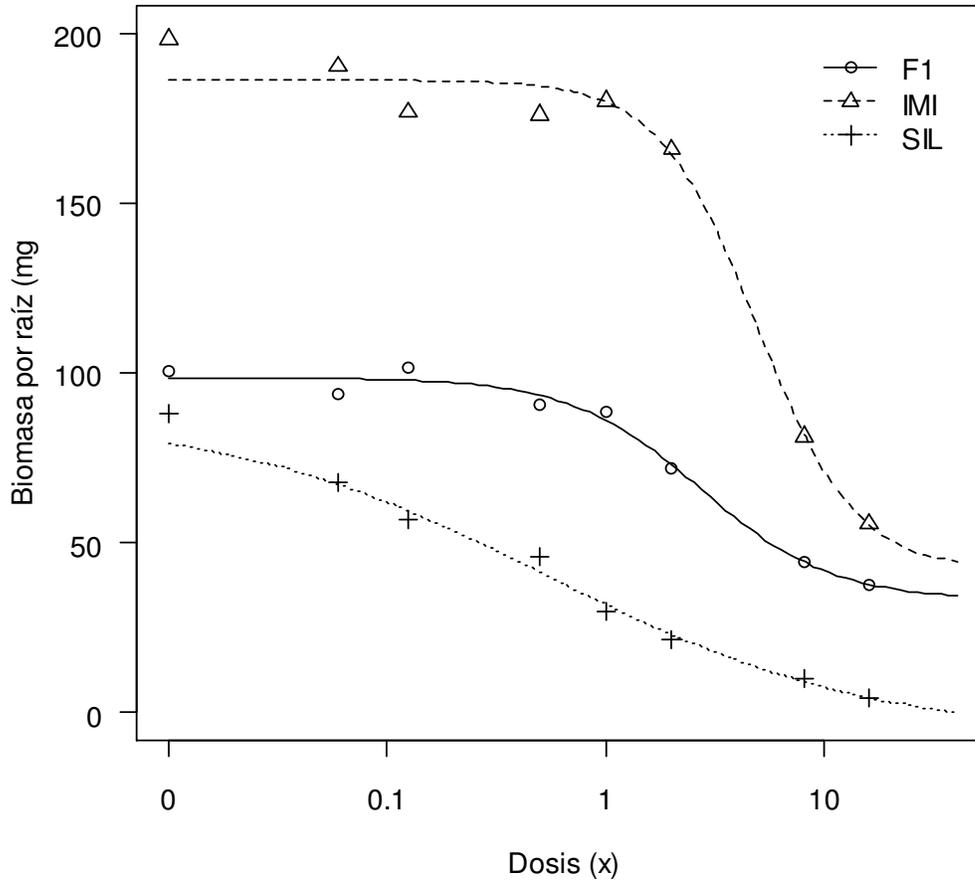
El parámetro b, pendiente relativa alrededor de e, fue mínima en SIL y máxima en IMI, del mismo modo que con la biomasa aérea. En los biotipos silvestres la disminución de la biomasa radicular fue gradual, mientras que para el híbrido comercial fue más abrupta. Las plantas F1 tuvieron un comportamiento intermedio (Figura 2.4).

Tabla 2.7: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de la biomasa radical por planta en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®), para *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).

Genotipo	Parámetros	valor estimado	p-valor
SIL	$b_{sil}$	0,7	**
	$d_{sil}$	87,3	**
	$e_{sil}$	0,4	**
F1	$b_{F1}$	1,5	*
	$c_{F1}$	33,1	*
	$d_{F1}$	98,5	**
	$e_{F1}$	2,7	*
IMI	$b_{imi}$	1,9	**
	$c_{imi}$	41,7	**
	$d_{imi}$	186,2	**
	$e_{imi}$	4,9	**
<sup>1</sup> ANOVA-prueba de falta de ajuste			
Modelo			
DRC		F-valor	p-valor
SIL		0,28	0,92
F1, IMI		0,80	0,61

<sup>1</sup>ANOVA para probar el ajuste a un modelo logístico con tres parámetros (SIL) y con cuatro parámetros (F1, IMI).

Figura 2.4: Biomasa radicular (mg) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para dos biotipos, *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).



Las curvas representan el modelo logístico con tres (SIL) y cuatro (F1, IMI) parámetros ajustado a la información recolectada en el experimento ( $Y_{SIL} \text{ (mg)} = 87,3 / (1 + (x/0,4)^{0,7})$ ;  $Y_{F1} \text{ (mg)} = 33,1 + 65,4 / (1 + (x/2,7)^{1,5})$ ;  $Y_{IMI} \text{ (mg)} = 41,7 + 144,5 / (1 + (x/4,9)^{1,9})$ ).

La relación entre la biomasa aérea y la biomasa de la raíz también fue alterada por la aplicación de imazapir. Por un lado, las plantas F1 y el híbrido CL no modificaron esa relación con el aumento de la dosis. Por el contrario, en las plantas silvestres la relación aumentó con el aumento de la dosis, detectándose diferencias significativas a partir de 8X. Esta relación se hizo máxima a 16X donde la relación planta/raíz fue cinco veces mayor que en el control (Tabla 2.8).

Tabla 2.8: Relación planta/raíz (media  $\pm$  error estándar) en función de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®) para dos biotipos de girasol, *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos (F1).

DOSIS	BIOTIPO		
	SIL	F1	IMI
0,00X	2,5 $\pm$ 0,1 a	2,8 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1
0,06X	2,5 $\pm$ 0,2 a	2,7 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2
0,13X	2,5 $\pm$ 0,2 a	2,6 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2
0,50X	2,5 $\pm$ 0,2 a	2,8 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2
1,00X	2,9 $\pm$ 0,1 a	2,3 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,1
2,00X	4,6 $\pm$ 0,8 ab	2,5 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1
8,00X	6,5 $\pm$ 1,0 b	2,4 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,2
16,00X	12,6 $\pm$ 1,3 c	2,6 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,3
ANOVA	**	ns	ns

### Experimento III

Todas las sulfonilureas utilizadas, aún en la dosis más baja, produjeron una mortandad de plantas mayor al 80% tanto para los tres genotipos evaluados. El iodosulfuron y prosulfuron fueron los herbicidas que causaron los mayores daños sobre las plantas con un promedio de mortandad mayor al 99% para todos los genotipos (Tabla 2.9).

La sulfonilurea clorimuron fue la que menos afectó al girasol aunque presentó un promedio de mortandad de 92% y 95% para la menor y mayor dosis, respectivamente. El híbrido CL fue el biotipo con mejor comportamiento a este herbicida ya que aún utilizando el doble de la dosis comercial, más del 16% de las plantas no fueron afectadas. Las F1 mostraron más daño que girasol CL aunque a media dosis sobrevivió, en promedio, un 7% de las plantas. Las poblaciones silvestres presentaron más de 97% de mortandad con la dosis más baja.

El metsulfuron causó una mortandad superior al 99%, para todos los genotipos, al doble de la dosis comercial. Aunque a media dosis las poblaciones silvestres mostraron cierto grado de tolerancia al herbicida con más de un 6% de individuos que sobrevivieron al herbicida. El híbrido CL fue eliminado con la menor dosis del herbicida. Mientras que

las F1 tuvieron un comportamiento intermedio entre los grupos anteriores, con más de un 3% de individuos que no fueron afectados.

El triasulfuron causó una mortalidad total de las plantas al doble de la dosis y para los tres genotipos. A mitad de dosis, el híbrido CL y las F1 mostraron más de un 5% de individuos que no fueron afectados por el herbicida.

Como era de esperar, las F1 y el híbridos CL tuvieron un mejor comportamiento frente a las imidazolinonas. Aunque la mortalidad de plantas con imazetapir fue ampliamente superior que con imazapir, éste no tuvo un control aceptable sobre el híbrido comercial ni sobre sus progenies aún en la dosis más alta, mientras que la mortalidad de plantas en poblaciones silvestres fue prácticamente total a media dosis.

A mitad de dosis, el imazetapir no afectó al híbrido CL, los cruzamientos mostraron más del 44% de individuos tolerantes mientras que las poblaciones silvestres fueron totalmente susceptibles. Al doble de dosis, el porcentaje de individuos tolerantes descendientes de cruzamientos disminuyó al 12%, mientras que para el híbrido CL fue más del 50%.

Analizando el efecto de los herbicidas sobre la materia seca, se detectó efecto altamente significativo entre biotipos, dosis y la interacción entre ambos, para todos los principios activos evaluados, excepto para imazetapir que no mostró interacción biotipo-dosis.

En concordancia con la información de fitotoxicidad, la materia seca disminuyó significativamente con la aplicación de las sulfonilureas utilizadas. Los biotipos sometidos a la aplicación de las imidazolinonas no respondieron de la misma forma (Figura 2.5).

El peso inicial de cada genotipo fue significativamente diferente. Las plantas del girasol cultivado tuvieron mayor peso que las plantas F1 y estas a su vez fueron más pesadas que las plantas del girasol silvestre. Sin embargo con todas las sulfonilureas utilizadas, la biomasa por planta del híbrido comercial CL disminuyó a una mayor tasa que en los otros dos biotipos, al aumentar la dosis de herbicida.

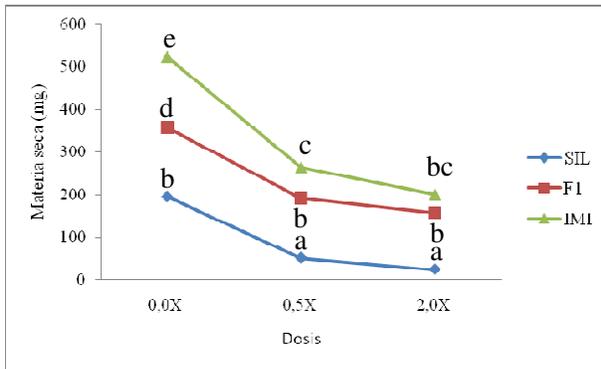
La materia seca del girasol cultivado y de las F1 no se vio afectada con el aumento de las dosis cuando se aplicó imazapir o imazetapir. Sin embargo el biotipo silvestre sufrió modificación de su biomasa por planta cuando se aumentó la dosis. Con imazapir la disminución fue gradual, detectándose diferencias sólo entre las dosis extremas. Por el contrario, con imazetapir la disminución de la materia seca fue abrupta, disminuyendo a menos de la mitad con 0,5X.

Tabla 2.9: Supervivencia (media  $\pm$  error estándar) de siete principios activos pertenecientes a las familias de las sulfonilureas e imidazolinonas sobre biotipos silvestres de *Helianthus annuus* (SIL), un híbrido comercial tolerante a imidazolinonas (IMI) y las progenies entre ambos (F1).

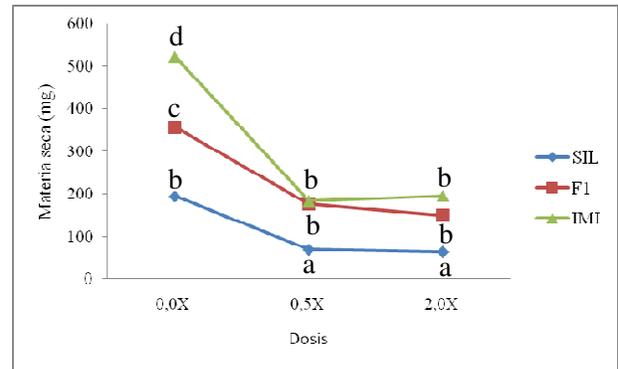
Herbicida	Dosis	BIOTIPO		
		SIL	F1	IMI
Testigo	0X	99,5 $\pm$ 0,5	99,6 $\pm$ 0,4	100,0 $\pm$ 0,0
Clorimuron	0,5X	2,6 $\pm$ 1,6	7,0 $\pm$ 1,9	19,6 $\pm$ 5,2
	2,0X	0,6 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 1,0	16,7 $\pm$ 4,0
Iodosulfuron	0,5X	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,8
	2,0X	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Metsulfuron	0,5X	6,6 $\pm$ 2,9	3,5 $\pm$ 1,3	0,0 $\pm$ 0,0
	2,0X	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
Prosulfuron	0,5X	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	2,0X	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Triasulfuron	0,5X	0,0 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 1,8	6,4 $\pm$ 2,0
	2,0X	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Imazapir	0,5X	3,0 $\pm$ 1,3	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	2,0X	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
Imazetapir	0,5X	0,0 $\pm$ 0,0	44,0 $\pm$ 5,8	97,5 $\pm$ 2,5
	2,0X	0,6 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 3,1	51,7 $\pm$ 5,0

Figura 2.5: Materia seca (mg) de plantas de *Helianthus annuus* silvestre (SIL), un híbrido comercial CL (IMI) y la progenie entre ambos biotipos (F1) bajo tres dosis y siete herbicidas de las familias de las sulfonilureas e imidazolinonas.

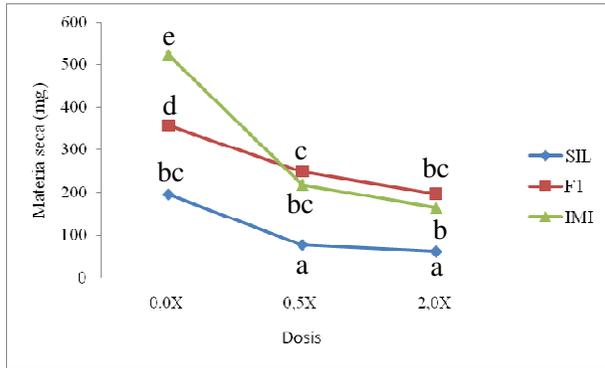
Clorimuron



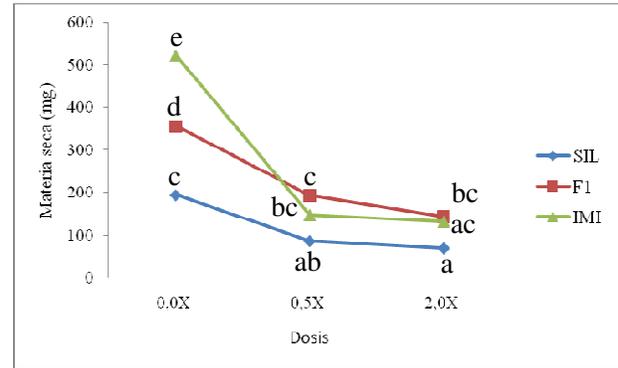
Iodosulfuron



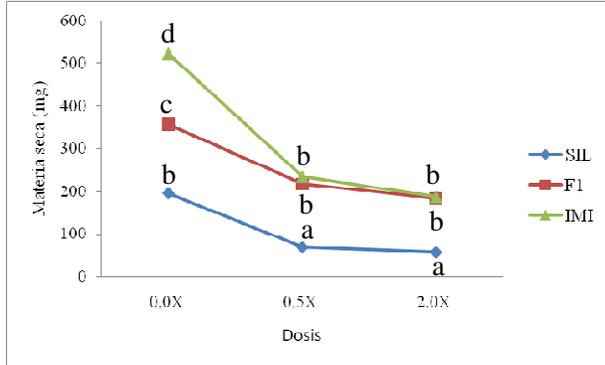
Metsulfuron



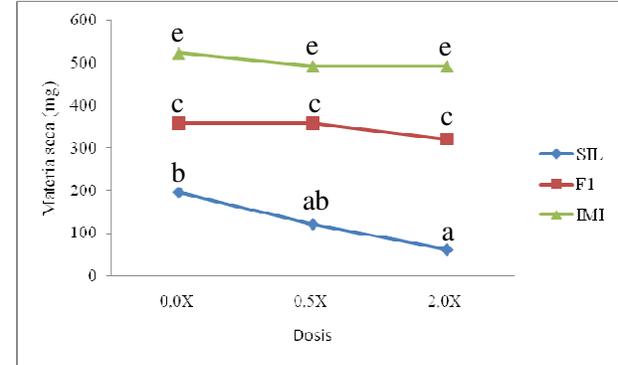
Prosulfuron



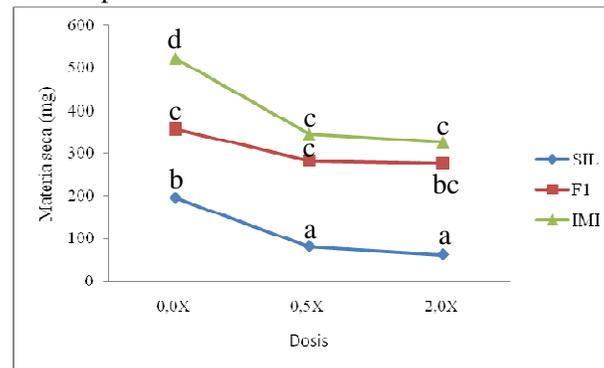
Triasulfuron



Imazapir



Imazetapir



Letras diferentes indican diferencias según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La supervivencia, la biomasa aérea y radicular respondieron a la aplicación de dosis crecientes de imazapir (Clearsol®). La biomasa radical fue más sensible que la biomasa aérea a la aplicación del herbicida, particularmente en los biotipos silvestres de girasol, lo que se reflejó en un cambio de la relación biomasa aérea/biomasa radical en las plantas (Tabla 2.3 y 2.7).

En los dos ensayos de dosis-respuesta, los resultados obtenidos fueron coincidentes. Ambos demostraron susceptibilidad de los biotipos silvestres de *H. annuus* a bajas dosis de imazapir. La dosis recomendada de este herbicida para el control de malezas en girasol eliminó totalmente las plantas de girasol silvestre. El híbrido comercial CL fue el biotipo más tolerante manifestando una DL50 136 veces mayor que la obtenida sobre los biotipos silvestres. Resultados similares se obtuvieron sobre plantas de *H. annuus* silvestre tolerantes a imazetapir en un lote en Kansas, las cuales fueron 170 veces más tolerantes que plantas de girasol silvestre no expuestas a la selección por el herbicida (Al-Khatib *et al.*, 1998). Aquella población se utilizó para transferir la tolerancia al girasol cultivado. Otra población resistente a imazetapir encontrada en Iowa fue 77 veces más tolerante que el control sin selección (Zelaya y Owen, 2004).

Tanto el primer experimento como el segundo, demostraron que el cruzamiento de plantas silvestres con el híbrido CL aumentó la tolerancia a imazapir, aunque la tolerancia fue menor que la del híbrido IMI-tolerante. Esto pudo ser apreciado mediante la escala visual de daño y la acumulación de biomasa aérea o radicular de las plantas (Figuras 2.2 a 2.4). Estos resultados coinciden con los formulados por Bruniard y Miller (2001) quienes evaluaron generaciones avanzadas de un híbrido entre HA89 e individuos de la fuente de tolerancia de Kansas. Ellos concluyeron que la tolerancia estaría gobernada por dos genes, uno mayor y un segundo con efecto modificador y que los genotipos intermedios, donde sólo uno de los parentales es homocigota dominante para ambos genes, no alcanzarían la máxima tolerancia ya que ambos loci quedan en heterocigosis.

En un trabajo realizado utilizando materiales de girasol domesticado con las seis combinaciones de los dos genes de tolerancia propuestos por Bruniard y Miller (2001),

se evaluó el crecimiento de las raíces sobre medios de cultivo con concentraciones crecientes de imazapir. La mayor tolerancia fue para el material homocigota dominante para los dos genes, tolerancia intermedia para el material heterocigota para ambos genes y la mayor susceptibilidad para el material homocigota recesivo para los dos genes (Breccia *et al.*, 2010). Allí la concentración más alta utilizada fue 10 uM, que equivaldría a 4X. En esta concentración se observó una disminución en la longitud de la raíz principal y de las raíces secundarias que se agudizó en el genotipo intermedio, mientras que en el genotipo susceptible las raíces desaparecieron. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo ya que la biomasa radicular del híbrido tolerante disminuyó en un 40%, la F1 lo hizo en más de un 60% y los biotipos silvestres disminuyeron la biomasa radicular en más de un 84% con respecto al control (Figura 2.4).

Sin embargo y de acuerdo a la ecuación de regresión obtenida en el segundo ensayo (Figura 2.2), la dosis de herbicida necesaria para obtener un control adecuado (>90%) de las plantas F1 sería mayor a 5 veces la dosis comercial o 416 g p.a ha<sup>-1</sup>. Además del aumento del costo de producción que esto conlleva, el incremento en la dosis podría acarrear consecuencias sobre los cultivos siguientes, como daño por fitotoxicidad debido a la residualidad en el suelo, que puede perdurar hasta dos años (Flint y Witt, 1997; Istilart, 2002; Ulbrich *et al.*, 2005; Moyer *et al.*, 2010). Dado que para evitar estos inconvenientes suele recomendarse rotar con otro cultivo IMI-tolerante, esto actuaría como un proceso de selección de malezas tolerantes (Hall y Devine, 1990; Sprague *et al.*, 1997; Whaley *et al.*, 2007). Por lo tanto, la aplicación en términos económicos y ecológicos sería desaconsejada.

En el ensayo de resistencia cruzada, el híbrido comercial CL tuvo buen comportamiento frente a imazapir. A su vez, toleró media dosis de imazetapir y más de un 50% de las plantas sobrevivieron al doble de la dosis comercial. Esta respuesta confirmaría que la mutación natural que fue transferida al girasol cultivado confiere resistencia cruzada a otros herbicidas dentro de la misma familia, tal como ha sido demostrado por Baumgartner *et al.*, (1999) y Sala *et al.*, (2008a), quienes evaluaron girasol resistente a imazetapir y encontraron tolerancia a imazamox. Sin embargo, esa resistencia cruzada no garantiza que este biotipo sea tolerante a todas las imidazolinonas, ya que la misma

línea que había sido tolerante a imazamox, imazapir e imazetapir resultó ser susceptible a imazapic (Tabla 2.10).

Si bien la mutación presente en el híbrido CL es conocida por producir amplia resistencia cruzada a inhibidores de AHAS (Tranel y Wright, 2002, Sala *et al.*, 2008a), esto no pudo corroborarse en este ensayo ya que el híbrido IMI-tolerante mostró tolerancia solamente a imazapir e imazetapir. Sin embargo, el cultivar DK3880CL también tuvo leve tolerancia a clorimuron: aplicando dos veces la dosis comercial se obtuvo una supervivencia cercana al 20% de las plantas. Esta leve tolerancia puede atribuirse a la mutación natural de la enzima AHAS, ya que la población de *H. annuus* de dónde provino la tolerancia también manifestó una DL50 dos veces superior a una población control (Baumgartner *et al.*, 1999). Otras dos poblaciones de *H. annuus* silvestre de South Dakota y Iowa mostraron tolerancia cruzada a imazetapir y clorimuron, aunque en Iowa la tolerancia a clorimuron fue superior a la de imidazolinona (White *et al.*, 2002, Zelaya y Owen, 2004, Tabla 2.10).

Todas las sulfonilureas e imidazolinonas utilizadas demostraron un control adecuado sobre los biotipos silvestres de *H. annuus*. Sin embargo, los herbicidas clorimuron, metsulfuron e imazapir, a baja dosis, no eliminaron la totalidad de plantas de *H. annuus* silvestre. Esto podría indicar que las poblaciones argentinas de *H. annuus* poseen naturalmente la mutación de la enzima que fue incorporada al girasol domesticado y que se conoce como tecnología Clearfield® (Miller y Al-Khatib, 2002) o bien una mutación distinta encontrada en poblaciones de *H. annuus* silvestre del norte de Kansas, que le confiere tolerancia a sulfonilureas (Miller y Al-Khatib, 2004).

Las plantas F1 tuvieron un comportamiento intermedio entre los biotipos silvestres y el híbrido comercial CL frente a los herbicidas utilizados. Con respecto a las imidazolinonas y como se demostró en los ensayos, toleraron dos veces la dosis comercial de imazapir y a su vez más 10% de plantas sobrevivieron a igual dosis de imazetapir. Algunos individuos también sobrevivieron a clorimuron y triasulfuron. Esta menor tolerancia que el híbrido CL a imazetapir y a clorimuron sería nuevamente causada por los genes de tolerancia en estado de heterocigosis (Bruniard y Miller, 2001).

De estos resultados se desprende que las plantas F1 derivadas del cruzamiento entre cultivares IMI-tolerantes y biotipos silvestres de *H. annuus* no podrían ser controladas con las dosis recomendadas de imazapir ni imazetapir, por lo que podrían convertirse en potenciales malezas en cultivos de girasol y maíz CL. En el caso del maíz CL, los herbicidas que se utilizan son On Duty® y Lightning®, este último es una mezcla de imazapir e imazetapir, por lo tanto la dosis comercial no lograría controlar malezas derivadas del cruzamiento girasol silvestre-cultivo CL.

La incorporación de tolerancia a imidazolinonas en los cultivos es una tecnología valiosa para el manejo de malezas, por la eficacia sobre un amplio espectro de especies, bajas dosis de uso y baja toxicidad en mamíferos de estos herbicidas (Tranel y Wright, 2002). Sin embargo, debería alternar o combinarse el uso de estos herbicidas con otros que posean diferentes mecanismos de acción para propiciar una mayor eficacia y duración de esta tecnología. La combinación de herbicidas es una estrategia valiosa ya que si multiplicamos la probabilidad de que aparezca una mutación para cada uno de los herbicidas, el resultado es una probabilidad tan baja que supone un retraso de la aparición de resistencia por muchas más generaciones (Powles *et al.*, 1997). Es así que la resistencia a glifosato de *Euphobia heterophylla* en cultivos de soja en Argentina ha promovido el estudio de combinaciones de herbicidas con distintos mecanismos de acción, siendo glifosato más lactofen e imazetapir más lactofen los que mostraron los mejores resultados (Vidal *et al.*, 2010). En España se detectaron 13 biotipos resistentes de *Sinapis alba* a tribenuron-metil en lotes de trigo. La imposibilidad de controlar esta maleza con dosis comerciales del herbicida sumada a la resistencia cruzada a otros herbicidas inhibidores de la AHAS, llevó a los autores a proponer la combinación de tribenuron-metil con MCPA o mecoprop-p (Rosario *et al.*, 2011). Estas prácticas junto con otras como la rotación de cultivo, combinación de distintos sistemas de labranza, monitoreo de los lotes y limpieza de la maquinaria serían útiles no sólo sobre malezas resistentes sino como estrategia de manejo integrada para minimizar la probabilidad de aparición de resistencia (Powles *et al.*, 1997; Bàrberi, 2004).

Tabla 2.10: Estudios sobre resistencia cruzada de *Helianthus annuus* a herbicidas inhibidores de AHAS. R/S: relación entre DL50 del genotipo tolerante y el susceptible. En el caso N° 2 la relación R/S está basada en I50 (inhibición del 50% de la actividad enzimática).

N	Material genético	Origen del material	Mutación	Herbicidas	X (g p.a/ha)	Dosis (n)	R/S	Valoración <sup>1</sup>	Cita
1	<i>H. annuus</i> silvestre resistente a imazetapir (Al-Khatib et al 1998)	Rossville, Kansas (USA)	Natural	imazamox clorimuron tifensulfuron cloransulam	43,7 11,0 4,4 14,0	8	309,5 2,0 3,3 1,4	T T T T	Baumgartner <i>et al.</i> , 1999
2	<i>H. annuus</i> silvestre con posible resistencia a imazetapir y clorimuron	Howard, South Dakota (USA)	Natural	imazetapir clorimuron	70,0 13,0	5	39,0 9,0	T T	White <i>et al.</i> , 2002
3	<i>H. annuus</i> silvestre con posible resistencia a imazetapir, imazaquin, clorimuron y tifensulfuron	Cherokee, Iowa (USA)	Natural	imazetapir clorimuron	70,0 8,6	8	77,2 96,9	T T	Zelaya y Owen, 2004
4	Linea endocriada, CLHA-Plus	Venado Tuerto, Santa Fe (ARG)	Inducida	imazamox imazapic imazapir clorsulfuron metsulfuron tribenuron	50,0 50,0 80,0 12,5 3,6 15,0	2  1	  nc <sup>2</sup>   	T T T S S S	Sala <i>et al.</i> , 2008a
5	Linea endocriada, RHA426 (derivada de 1)	Fargo, North Dakota (USA)	Natural	imazamox imazapic imazapir clorsulfuron metsulfuron tribenuron	50,0 50,0 80,0 12,5 3,6 15,0	2  1	  nc   	T S T T MT MT	Sala <i>et al.</i> , 2008a

<sup>1</sup> Valoración realizada por los autores: Tolerante (T), moderadamente tolerante (MT), susceptible (S)

<sup>2</sup> nc: no corresponde

### **Capítulo 3 : CARACTERIZACION MOLECULAR DE POBLACIONES SILVESTRES DE *Helianthus annuus* Y SUS F1 CON UN CULTIVAR TOLERANTE A IMIDAZOLINONAS**

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS) o acetolactato sintetasa (ALS) es una enzima esencial en la síntesis de los aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina en plantas. AHAS cataliza la conversión de piruvato en 2-acetolactato que participa en la biosíntesis de valina y leucina y también convierte el 2-cetobutirato en 2-ceto-2-hidroxiacetato, que interviene en la síntesis de isoleucina (Duggleby y Pang, 2000).

La sustitución de una base en los genes que codifican para AHAS puede cambiar la tolerancia a herbicidas inhibidores de esta enzima (Tan *et al.*, 2005). Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* la mutación natural de adenina por guanina en el codón 653 causó el cambio del aminoácido serina a asparagina que otorgó 100 veces más resistencia a imazapir que el genotipo control (Sathasivan *et al.*, 1991). En *Xanthium* sp. la mutación natural de alanina por treonina en el codón 133 otorgó tolerancia a imazetapir mientras que el cambio de triptófano por leucina en el codón 552 otorgó tolerancia a todos los inhibidores de AHAS evaluados (Bernasconi *et al.*, 1995). En *Ambrosia artemisiifolia* una mutación espontánea en el codón 574 que sustituyó triptófano por leucina otorgó resistencia a cloransulam (Patzoldt *et al.*, 2001). Un caso reciente es el de *Salsola tragus*, una maleza importante en Canadá, en la cual las mutaciones naturales en los codones 574, leucina por triptófano y 197, glutamina por prolina, confirieron a esta especie tolerancia a sulfonilureas, transformándola en una especie de difícil control en trigo (Warwick *et al.*, 2010).

En girasol, la tolerancia a imidazolinonas fue descubierta en Kansas (EEUU) en 1996 en un lote que había estado siete años en monocultivo de soja y bajo la utilización continua de imazetapir. Se identificó un biotipo de *Helianthus annuus* que fue 170 veces más tolerante que un biotipo susceptible. El incremento en la tolerancia a imidazolinonas fue atribuido a la disminución en la sensibilidad de la enzima AHAS al herbicida (Al-Khatib *et al.*, 1998).

Evaluando generaciones avanzadas del cruzamiento entre la línea pura HA89 y la población resistente a imidazolinonas de Kansas, se estimó que la tolerancia estaría

gobernada por dos genes, un gen mayor con efecto semidominante (*Imr1*) y un segundo gen con efecto modificador (*Imr2*) cuando el primero está presente (Bruniard y Miller, 2001).

Kolkman *et al.*, (2004) identificaron tres genes que codifican para la enzima, AHAS1, AHAS2 y AHAS3. No se encontró polimorfismo en el gen AHAS2 entre los materiales tolerantes y susceptibles a imidazolinonas y sulfonilureas. A su vez, hallaron que una mutación en el codón 205 del gen AHAS1 confería la tolerancia a imidazolinonas, mientras que una mutación en el codón 197 confería tolerancia a sulfonilureas. Los autores también desarrollaron iniciadores (primers) para detectar variantes alélicas en un microsatélite ligado al AHAS1. Esta misma substitución de valina por alanina en el codón 205 también fue hallada en otra población de *Helianthus annuus* silvestre colectada en South Dakota que había resultado tolerante a imazetapir y clorimuron (White *et al.*, 2003).

Recientemente investigadores argentinos han logrado, mediante mutagénesis inducida sobre líneas elite de girasol, una variante en el codón 122 del gen AHAS1 que produce en plantas poseedoras del nuevo carácter, mayores niveles de tolerancia y mayor selectividad a imidazolinonas que la tecnología Clearfield® tradicional (Sala *et al.*, 2008a). Este nuevo gen, denominado CLHA-plus, estará disponible en variedades comerciales en la campaña 2010-2011 (BASF, 2010).

Los primers desarrollados por Kolkman *et al.*, (2004) permitirían confirmar la incorporación de la tolerancia a imidazolinonas en progenies entre *H. annuus* silvestre y un híbrido CL y también serviría para explorar la presencia de esta mutación natural en poblaciones de girasol silvestre argentinas.

Por lo tanto, sería posible caracterizar molecularmente las plantas tolerantes y no tolerantes al herbicida, ya que difieren en alelos que codifican variantes de la enzima AHAS. El objetivo del presente capítulo es lograr una identificación mediante marcadores moleculares, que permita determinar eficazmente si en una población silvestre hay resistencia al herbicida.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Material vegetal**

Para evaluar la transferencia del carácter tolerancia a imidazolinonas hacia las poblaciones silvestres, se realizaron cruzamientos manuales entre individuos silvestres de *H. annuus* y un material comercial tolerante a imidazolinonas.

El germoplasma silvestre utilizado estuvo constituido por cinco biotipos silvestres representativos de *H. annuus* colectados en la región central argentina. Río Cuarto (RCU); Colonia Barón (BAR); Adolfo Alsina (AAL); Diamante (DIA) y Las Malvinas (LMA).

El material domesticado utilizado estuvo constituido por el híbrido comercial DK3880 CL®, cedido por Agronomía Lindón y las líneas endocriadas HA89, HAR2, HAR3, HAR 5, HA369 y RHA274. Estas líneas, provistas por investigadores de EEA INTA Balcarce, han sido ampliamente utilizadas en el mejoramiento genético del girasol en el país.

Durante la campaña 2004-2005, previo a la siembra, las semillas se colocaron en bandejas de plástico, entre papel, en heladera a 5° C por un período de una semana, con el objeto de romper la dormición y aumentar el porcentaje de germinación (ISTA 2004). Se utilizaron bandejas de plástico de 28 x 54 cm, con 200 celdas para cría de plantines. La siembra se realizó utilizando sustrato de lombricompuesto, disponiendo dos semillas por celda. La cría se realizó durante 30 días luego de la emergencia, en un invernadero climatizado, utilizando condiciones de luz natural y 25-27° C. El trasplante se efectuó cuando las plantas tenían 4-6 hojas y una altura aproximada de 10 cm.

El jardín común se realizó en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Las plantas se dispusieron agrupadas por biotipo, en líneas distanciadas a 2,10 m entre sí, con una separación entre individuos de 0,25 m. Se utilizó un sistema de riego presurizado compuesto por tuberías emisoras (m.c. UNE 68-076) operado en concordancia con las necesidades del cultivo.

Los cruzamientos controlados se realizaron tapando capítulos antes de la floración (en R4, considerando por analogía la escala de Schneiter y Miller 1981) de plantas de los cinco biotipos. Durante 4 a 7 días posteriores al tapado y hasta completar la floración de todo el capítulo (R6) se polinizó manualmente 2 ó 3 veces, utilizando polen de plantas del híbrido comercial tolerante a imazapir DK3880CL®. También se realizó un cruzamiento como control entre la línea susceptible HA89 y el híbrido comercial tolerante DK3880CL®.

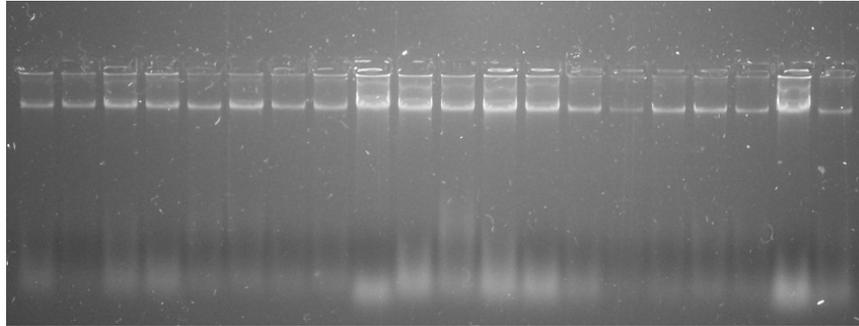
Las semillas cosechadas sobre plantas silvestres (F1) fueron sembradas en bandejas de plástico y criadas hasta el estadio de cuatro hojas. En ese momento fueron pulverizadas con imazapir (Clearsol®) al doble de la dosis recomendada (80 g p.a/ha) utilizando una mochila aspersora con una boquilla Teejet® 8002. La sintomatología fue registrada 15 días posteriores a la aplicación. Las plantas sobrevivientes fueron trasplantadas al campo y retrocruzadas con el híbrido comercial (R1).

### **Marcadores microsatélites**

Se colectaron hojas jóvenes de las cinco F1 (50), R1 (20), biotipos silvestres (250), líneas endocriadas, híbrido comercial y la cruce HA89 x DK3880CL® (10). Las hojas fueron almacenadas en un ultra-freezer (-70 °C). Las muestras fueron liofilizadas y molidas manualmente.

Las extracciones de ADN genómico se realizaron mediante un método CTAB (CIMMYT, 2006). Las modificaciones sobre el protocolo propuesto fueron: el material molido inicial fue de aproximadamente 100 mg (un tercio del material sugerido en el protocolo original), por lo tanto, el resto de los reactivos utilizados también fueron reducidos a un tercio y no se utilizó ARNasa. El ADN genómico obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro y leyendo absorbancia a longitudes de onda de 260 (A260) y 280 nm (A280). Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280 y se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 3.1). La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula: [ADN] = A260 x factor de dilución x 50 ng/ul.

Figura 3.1: ADN genómico de plantas de *Helianthus annuus* silvestre obtenido con el método CTAB. La banda intensa de alto peso molecular indica que el ADN no se encuentra degradado.



La evaluación molecular de tolerancia a imidazolinonas se realizó utilizando un marcador microsatélite (SSR) que permite identificar variantes alélicas en el gen AHAS1. Se utilizaron los primers pAHAS16/17 y pAHAS18/19 desarrollados por Kolkman *et al.*, (2004). Se estableció la temperatura de hibridación (TA) para cada primer. En un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l se colocaron: buffer PCR Gibco 10X; Cl<sub>2</sub>Mg (2,5 mM), dNTP (0,125M cada uno), primers F y R (5,5 pmol cada uno), 1 unidad de Taq polimerasa y 60 ng de ADN genómico, se llevó a volumen con agua ultra pura. Para la amplificación se utilizó un programa de PCR con touchdown (Don *et al.*, 1991). La desnaturalización inicial se realizó a 95°C durante 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, (TA + 5°C) por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. La temperatura de hibridación fue decreciendo un grado por ciclo en los siguientes ciclos hasta alcanzar (TA - 5°C). Los productos de PCR fueron seguidamente amplificados durante 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, TA por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos. Los productos de PCR fueron inicialmente separados y cotejados en geles de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6%. Se sembraron 7  $\mu$ l del producto de cada amplificación y se corrió a 50 W durante dos horas en una cuba de secuenciación Sequi-Gen GT BioRad. Se incluyó un marcador de peso molecular 30-330bp Step ladder (Promega). Las bandas SSR fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata y escaneadas. La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que cada banda representaba un locus simple con alelos codominantes.

Tabla 3.1: Secuencias de los primers utilizados para la evaluación de F1, R1, poblaciones silvestres, líneas endocriadas, híbrido comercial y la cruce control (HA89 x DK3880CL®).

Primer	Secuencia
p-AHAS16	F C C C C G T T T C G C A T T A C C C A T C A C T
p-AHAS17	R A C C A A C A C G T C T G C G C C T T T T C T C
p-AHAS18	F T T C C T C C C C C G T T T C G C A T T A C
p-AHAS19	R C G C C G C C C T G T T C G T G A C

Se realizaron pruebas Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y la prueba de ajuste a la ley de Hardy-Weinberg sobre las cinco poblaciones evaluadas.

## RESULTADOS

El 98% de las 307 plantas de las poblaciones silvestres evaluadas mostraron necrosis del ápice y clorosis en las hojas superiores, indicando la muerte de la planta. El 2% de los individuos sobrevivió a la aplicación del herbicida. Por otro lado, la frecuencia de plantas sobrevivientes sobre 350 plantas F1 híbridas silvestre-IMI aumentó al 38% (Figura 3.2). Estas plantas se caracterizaron por presentar el ápice sin daño. Algunos de los individuos presentaron clorosis en las hojas superiores, síntoma que posteriormente desapareció.

Ambos pares de primers (p16/17 y p18/19) que están ligados al locus AHAS1 mostraron polimorfismo entre de los genotipos analizados. Los fragmentos amplificados por el par de primers p16/17 revelaron un tamaño de banda cercano a las 200 pb, mientras que aquellos amplificados por el par de primers p18/19 mostraron un tamaño de bandas de alrededor de 300 pb.

El par de primers p16/17 mostró un patrón de bandas claro para los genotipos cultivados y los cruzamientos silvestre-cultivado (Figura 3.3), aunque los individuos de las poblaciones silvestres no pudieron ser analizados con este marcador debido a la baja calidad de revelado obtenida. Por el contrario, el par de primers p18/19 mostró un

patrón claro para todos los biotipos analizados por lo que se decidió continuar con este marcador.

Figura 3.2: Mortandad de biotipos silvestres de *Helianthus annuus* (SIL) y sus progenies (F1) con un híbrido CL luego de la aplicación de imazapir (2X) en el estadio de cuatro hojas. Las frecuencias fueron analizadas mediante tablas de contingencia utilizando el Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson como estadístico.

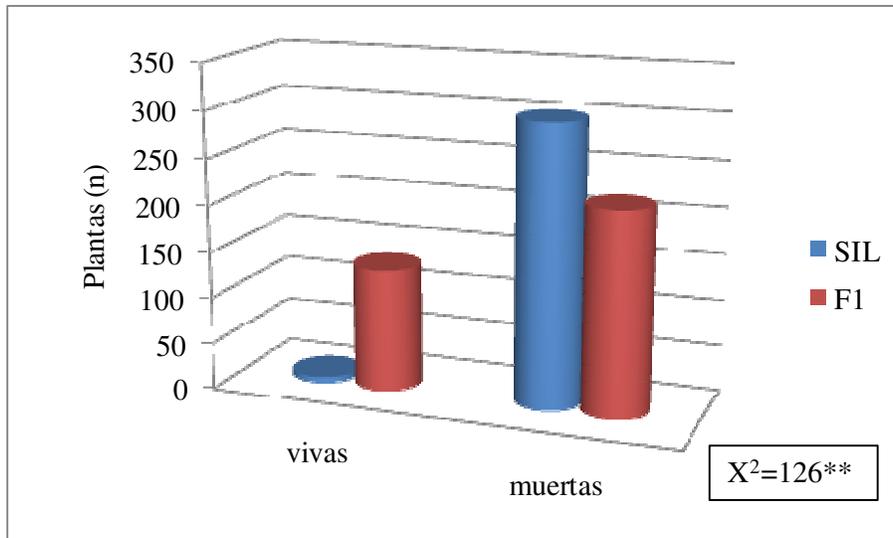
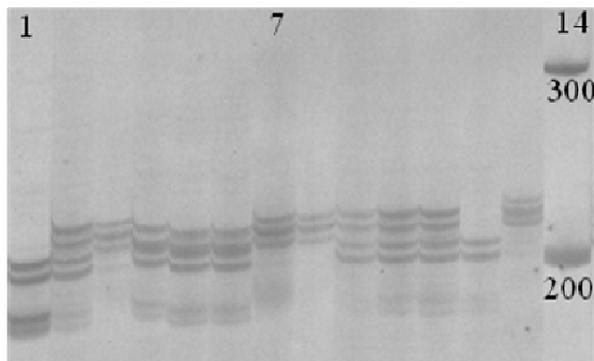


Figura 3.3: Patrón de amplificación del par de primers p16/17 ligados al locus AHAS1. Calles 3, 7, 8 y 13 corresponde a genotipos homocigotas susceptibles. Calles 1 y 12 corresponde a genotipos homocigotas tolerantes. Calles 2, 4-6 y 9-11 corresponde a genotipos heterocigotas tolerantes. Marcador de peso molecular en calle 14.



El híbrido comercial CL reveló una banda única de aproximadamente 312 pb, mientras que todas las líneas endocriadas probadas mostraron una banda única de

aproximadamente 318 pb. Los cruzamientos controlados entre HA89 y el híbrido comercial CL presentaron ambas bandas, de 312 y 318 pb, comprobándose el origen híbrido. Es así que el híbrido CL tuvo el genotipo dominante (Imr1Imr1) que le confiere tolerancia a imazapir, las líneas endocriadas evaluadas presentaron el genotipo homocigota recesivo (imr1imr1) que las hacen susceptibles al herbicida, mientras que los individuos híbridos entre HA89 y DK3880CL presentaron el genotipo heterocigota (Imr1imr1).

En tres de las cinco poblaciones silvestres, el 93% de los individuos presentaron el genotipo homocigota susceptible, el 5% genotipo heterocigota tolerante y el 2% genotipo homocigota tolerante (Figura 3.4). Mientras, sus respectivas cruzas con el híbrido CL (F1) sobrevivientes a imazapir (2X) mostraron un 97% de individuos heterocigotas tolerantes y un 3% de individuos homocigotas tolerantes (Tabla 3.2).

Las frecuencias alélicas para el locus AHAS1 fueron diferentes en las tres poblaciones. DIA tuvo una frecuencia del alelo Imr1 de 0,02, LMA de 0,05 y RCU de 0,07. La frecuencia observada de genotipos en DIA y RCU ajustó a la esperada según la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que no sucedió lo mismo en la población de LMA (Tabla 3.3)

Tabla 3.2: Genotipos identificados con los primers p18/19 (AHAS1) en tres biotipos silvestres de *Helianthus annuus* y sus respectivas cruzas con el híbrido CL (F1). imr1imr1: homocigota susceptible; Imr1imr1: heterocigota tolerante; Imr1Imr1: homocigota tolerante. Los datos fueron analizados mediante tablas de contingencia utilizando el Chi-cuadrado de Pearson.

Poblaciones	Genotipos (n)			Total
	imr1imr1	Imr1imr1	Imr1Imr1	
Diamante	49	2	0	51
Las Malvinas	47	1	2	50
Río Cuarto	45	5	1	51
F1	0	29	1	30
Chi cuadrado	p<0,01**			
Chi cuadrado SIL <sup>1</sup>	p=0,25 ns			

<sup>1</sup>análisis sin las F1.

Todos los individuos F1 de DIA y LMA retrocruzados en el híbrido CL mostraron el alelo de la tolerancia en estado homocigota al igual que el híbrido CL (Figura 3.4).

Las dos poblaciones restantes, BAR y AAL mostraron un comportamiento diferente, difiriendo de los resultados arrojados por los ensayos de herbicidas (Figura 3.2, capítulo 2). En BAR el 58% de los individuos presentó el genotipo homocigota que confiere la tolerancia (*Imr1Imr1*), el 36% presentó el genotipo heterocigota tolerante (*Imr1imr1*) y solamente el 6% mostró el genotipo homocigota susceptible (*imr1imr1*).

AAL presentó el 20% de los individuos que mostraron el genotipo homocigota susceptible, un 8% presentó el genotipo heterocigota tolerante y otro 8% presentó el genotipo homocigota tolerante. El 64% de los individuos restantes mostraron combinaciones con un alelo que no había sido identificado en ninguno de los genotipos evaluados. Este alelo, identificado como A327, se diferenció del alelo de la susceptibilidad y tuvo un tamaño de aproximadamente 327 pb (Figura 3.5).

La frecuencia del alelo *Imr1* en las poblaciones de AAL y BAR fue de 0,23 y 0,76 respectivamente. La heterocigosis promedio en las poblaciones silvestres fue variable. En DIA y LMA fue menor a 0,05 mientras que en las poblaciones de AAL y BAR fue elevada, alrededor de 0,60. En RCU fue intermedia entre aquellas (Tabla 3.3).

Las F1 silvestre-cultivado de BAR y AAL también mostraron un patrón de bandas inesperado ya que en el caso de BAR, todas las plantas presentaron el alelo de la tolerancia en estado homocigota mientras que entre las F1 de AAL, el 40% presentó el alelo en estado homocigota y el 60% restante en estado heterocigota.

En AAL y BAR la frecuencia del alelo de la tolerancia fue elevada y no se correspondió con los resultados obtenidos en los ensayos con imazapir. En la población AAL apareció la nueva variante alélica que no había sido identificada en ninguno de los genotipos evaluados previamente. Al considerar el ambiente en donde habitan estas dos poblaciones, ambas resultaron convivir con la especie silvestre *H. petiolaris*. Estos sitios se caracterizan por la presencia de ambas especies silvestres así como de individuos con características intermedias (Poverene *et al.*, 2008). Por ello se procedió a

evaluar individuos de poblaciones de *H. petiolaris* provenientes de estos sitios utilizando la metodología previamente descrita.

Figura 3.4: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para las población de Diamante, DIA (calles 1-11 y 24-35), F1 Diamante-CL retrucruzada con CL (calles 12-21). La calle 22 corresponde a la línea endocriada HA89 y la calle 23 al híbrido DK3880CL. La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (*Imr1Imr1*), la flecha azul el genotipo homocigota susceptible (*imr1imr1*) y la flecha amarilla al genotipo heterocigota tolerante (*Imr1imr1*).

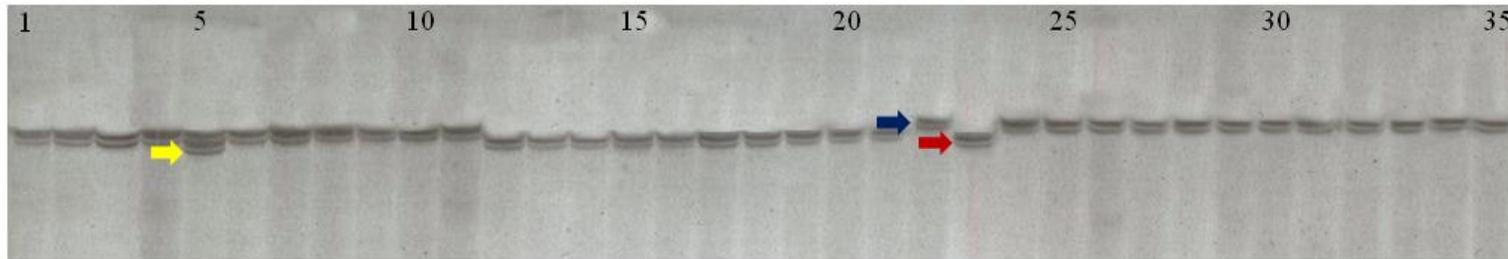
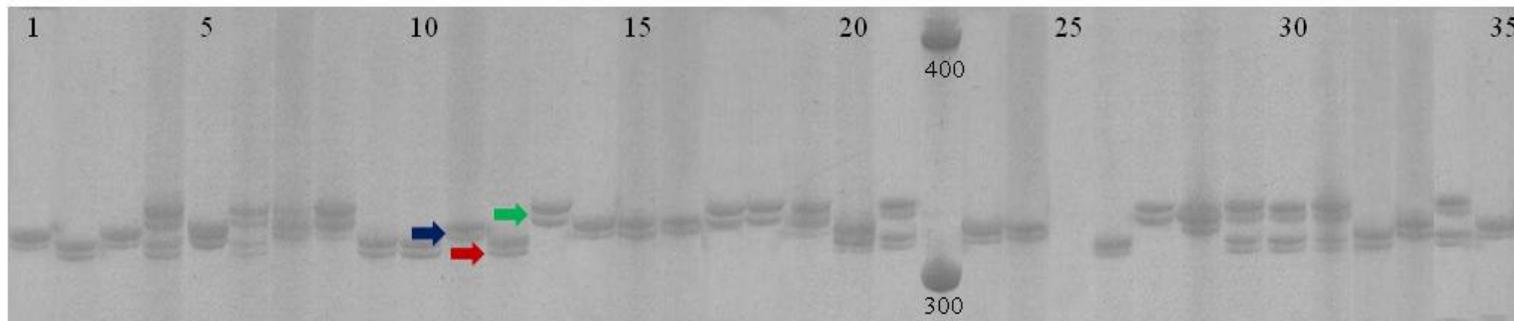


Figura 3.5: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para la población de Adolfo Alsina, AAL (calles 3-21 y 27-35), las líneas endocriadas HA369 (calle 1), HAR5 (calle 23), HAR2 (calle 24) y el híbrido DK3880 CL (calles 2 y 26). La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (*Imr1Imr1*), la flecha azul al genotipo homocigota susceptible (*imr1imr1*) y la flecha verde el nuevo alelo (A327). Marcador de peso molecular en la calle 22 y blanco en la calle 25.

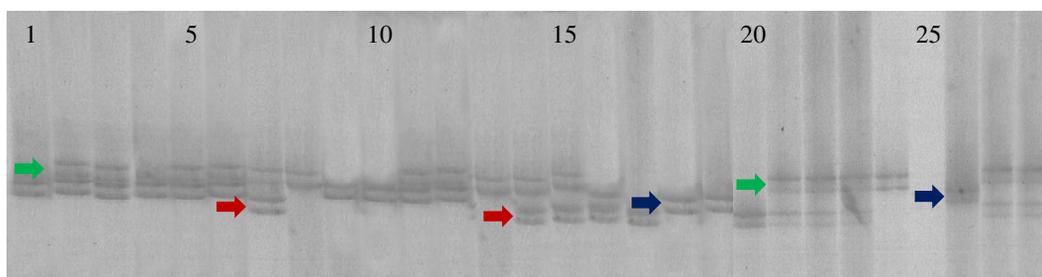


Entre los individuos de *H. petiolaris* se identificó la banda ligada a la tolerancia, así como también el alelo A327 encontrado en la población de *H. annuus* de AAL. El alelo ligado a la tolerancia se encontró en el 25% de las plantas evaluadas mientras que A327 estuvo en alta frecuencia, 69% de las plantas (Figura 3.6).

Tabla 3.3: Alelos, heterocigosis promedio, frecuencias alélicas y ajuste al modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg en cinco poblaciones silvestres argentinas de *Helianthus annuus* para el locus AHAS1, amplificado con los primers p18/19.

Locus AHAS1	DIA	LMA	RCU	AAL	BAR
Alelos (n)	2	2	2	3	2
Heterocigosis promedio	0,04	0,00	0,10	0,60	0,60
Frecuencias alélicas					
Imr1	0,02	0,05	0,07	0,23	0,76
imr1	0,98	0,95	0,93	0,39	0,24
A327	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
Equilibrio de Hardy-Weinberg					
Chi cuadrado	0,00	42,64	0,01	5,00	0,01
p-valor	0,98	0,00	0,91	0,17	0,93

Figura 3.6: Patrón de bandas amplificadas con los primers p18/19 para plantas de *Helianthus petiolaris* provenientes de Colonia Barón (BAR, calles 1-6) y Adolfo Alsina (AAL, calles 7-16), población de *Helianthus annuus* de Adolfo Alsina (calles 20-28), el híbrido DK3880 CL (calle 17) y las líneas endocriadas (calles 18-19). La flecha roja indica el genotipo homocigota tolerante (Imr1Imr1), la flecha azul al genotipo homocigota susceptible (imr1imr1) y la flecha verde el nuevo alelo A327.



## DISCUSIÓN

Los primers p18/19 que codifican para un microsatélite ligado al gen AHAS1 (Kolkman *et al.*, 2004) permitieron caracterizar tres poblaciones silvestres, sus progenies silvestre-cultivado, líneas susceptibles, el híbrido CL y cruzamientos entre estas dos últimas. Estos primers permitieron también diferenciar la nueva variante alélica (ALA122) obtenida por mutagénesis inducida, de la convencional (ALA205) surgida por mutación natural (Sala *et al.*, 2008b). Los resultados validan la utilidad de estos primers para la selección de genotipos tolerantes a imidazolinonas en girasol domesticado.

Los tres genotipos identificados (imr1imr1, Imr1imr1, Imr1Imr1) se correlacionaron con los resultados previamente obtenidos mediante los ensayos con el herbicida imazapir (Capítulo 2). Los genotipos susceptibles (imr1imr1) fueron eliminados con bajas dosis del herbicida, mientras que los genotipos tolerantes (Imr1Imr1) no fueron eliminados aún con más de seis veces la dosis comercial. Los genotipos heterocigotas (Imr1imr1) tuvieron un comportamiento intermedio, tolerando más de tres veces la dosis comercial (Figura 2.1), por lo que a los fines prácticos se los puede considerar tolerantes.

Esta herramienta también permitió identificar genotipos con la mutación ALA205 entre los individuos de las poblaciones silvestres de *H. annuus* argentinas. Si bien la frecuencia encontrada fue muy baja, esta situación podría cambiar si las plantas fueran seleccionadas por el herbicida o fueran expuestas a flujo génico de materiales comerciales IMI-tolerantes.

En un estudio realizado en EEUU se evaluó el flujo génico, crecimiento y competitividad entre poblaciones silvestres de *H. annuus* tolerantes y susceptibles a imidazolinonas. La dispersión del carácter IMI alcanzó los 30 metros de distancia, a su vez los genotipos tolerantes crecieron y fueron igualmente competitivos que los susceptibles (Marshall *et al.*, 2001), sugiriendo que no existe costo adaptativo por este carácter. Es por ello que los autores concluyen que se podría esperar que este carácter permanezca en las poblaciones silvestres y que su frecuencia aumente con el uso de esta tecnología.

Los haplotipos amplificados por los primers p18/19 en las poblaciones de AAL y BAR no reflejaron los resultados arrojados por los ensayos de herbicidas (Figura 3.2, Capítulo 2) debido a la elevada frecuencia del alelo de la tolerancia y a la identificación de un nuevo alelo

(A327). Al analizar individuos de *H. petiolaris* de estos dos sitios se encontró también el alelo de la tolerancia en alta frecuencia, siendo las plantas también eliminadas con bajas dosis de imazapir (M. Casquero, *com. pers.*) y el alelo A327 en la mayoría de los individuos evaluados. Esto apoya los hallazgos morfológicos de hibridación (Poverene *et al.*, 2008), las plantas de *H. petiolaris* y *H. annuus* en estas zonas se cruzan y hay introgresión de caracteres en ambas especies. Ambas difieren en al menos 11 translocaciones e inversiones cromosómicas (Burke *et al.*, 2004) lo que posiblemente ha llevado a un cambio en la posición de este microsatélite. Rieseberg *et al.*, (1995) utilizando RAPD en *H. anomalous*, un especie derivada de la hibridación entre *H. annuus* y *H. petiolaris*, encontraron una reorganización del genoma con respecto a sus especies parentales. Hallaron nuevos alelos específicos de *H. anomalous* que no estaban presentes en los padres así como alelos que sólo estaban presentes en las especies parentales, lo que fue atribuido a la recombinación y reorganización del genoma. En un estudio de QTL ligados al contenido y composición de aceite en F3 derivadas de un cruzamiento entre una línea elite de girasol y *H. annuus* silvestre, Burke *et al.*, (2005) concluyen que la heterogeneidad en la pérdida de diversidad del grupo de ligamiento 6 en las líneas elite vs. girasol silvestre, puede ser explicada por cambios en la posición de los microsatélites por rearrreglos estructurales.

Esto restringiría la utilidad de los primers p18/19 a poblaciones silvestres de *H. annuus* que no estén en contacto con poblaciones de *H. petiolaris* como las poblaciones de DIA, LMA y RCU. A su vez, confirma la utilidad de esta herramienta en la selección de genotipos tolerantes en programas de mejoramiento de girasol doméstico.

La confirmación de la transferencia de la tolerancia a través de la aplicación de imazapir y utilizando los primers p18/19 ligados al locus AHAS1 ponen de manifiesto el riesgo del manejo de esta tecnología sin los recaudos necesarios. La tecnología CL está en pleno auge y seguramente seguirá creciendo con el lanzamiento de la nueva tecnología CHLA-plus creada a través de mutagénesis inducida en líneas elite de girasol (Sala *et al.*, 2008a).

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo con imazapir realizado para este capítulo (Figura 3.2) y los obtenidos en el capítulo previo se observa una elevada mortandad de plantas F1 en este ensayo, cerca del 60% de las plantas silvestre-cultivado murieron luego de la aplicación del herbicida en doble dosis, no habiéndose detectado prácticamente mortandad en los otros ensayos a esa dosis (Tabla 2.3, Figura 2.1). La diferencia metodológica que

explicaría estos resultados sería que en el primer caso, las plantas de girasol silvestre no fueron emasculadas previo a la polinización con polen del híbrido CL, técnica que se utilizó en los ensayos posteriores. Estudios realizados entre *H. annuus* y *H. petiolaris* han demostrado que la mezcla de polen propio y heteroespecífico afecta el sistema de autoincompatibilidad de estas especies y aumenta el porcentaje de autofecundación, este fenómeno se conoce con el nombre de efecto mentor (Desrochers y Rieseberg, 1998). Por lo tanto, la excesiva mortandad de plantas se debería al porcentaje de las semillas que se obtuvieron producto de la autofecundación y no del cruzamiento con el híbrido comercial de girasol CL. Este fenómeno también fue observado en un estudio de flujo génico entre *H. annuus* y *H. petiolaris* y un híbrido de girasol IMI-tolerante (Massinga *et al.*, 2003). A pesar de que en este caso estamos en presencia de la misma especie, la selección realizada por el hombre ha causado rearrreglos estructurales en el genoma del girasol domesticado (Burke *et al.*, 2005) que actuarían como barreras a la hibridación.

#### **Capítulo 4 : CARACTERIZACION DE LA INTERFERENCIA DE MALEZAS DEL GENERO *Helianthus* EN UN LOTE DE GIRASOL**

Las malezas son especies que crecen en lugares no esperados. Esta definición incluye a las plantas voluntarias de especies cultivadas que crecen en un momento y lugar indeseados (Håkansson, 2003). La reducción del rendimiento y de la calidad de los cultivos, el incremento de los costos de producción y la disminución del valor de la tierra, son algunos de los efectos negativos que pueden causar las malezas (Booth *et al.*, 2003). Las malezas causan pérdidas globales en producción de alimento cercanas a los 95 billones de dólares por año, que es más de lo que se pierde por patógenos, insectos o vertebrados. De estos 95 billones, 70 se pierden en países pobres (Labrada-Romero, 2009).

El girasol silvestre ha sido una fuente de variabilidad en la mejora del girasol cultivado, pero también ha sido identificado como una importante maleza. Geier *et al.*, (1996) calificaron al girasol silvestre como una de las malezas más competitivas en soja, ya que realizando ensayos en Kansas, en lotes naturalmente infectados, pudieron comprobar que con 4,6 plantas m<sup>-2</sup> de *Helianthus annuus*, el rendimiento se redujo entre un 95 y 97%. En Missouri, la interferencia de *H. annuus* sobre soja ha causado mermas en el rendimiento que variaron entre 32 y 72% con en una densidad de 3 plantas m<sup>-2</sup> sugiriendo que el período crítico de control de esta especie es entre 4-8 semanas después de la siembra (Allen *et al.*, 2000). Otro experimento en maíz, realizado en Kansas, estimó que la interferencia de 4 plantas m<sup>-2</sup> de *H. annuus* disminuyó el rendimiento del cultivo en un 46%. En este ensayo, el girasol silvestre fue cuatro veces más competitivo que el sorgo (Deines *et al.*, 2004). También se ha estudiado la interferencia de plantas voluntarias de girasol cultivado sobre trigo. Las mermas superaron el 30% cuando la maleza estuvo en una densidad de 23 plantas m<sup>-2</sup>, siendo el número de macollos por planta y de espiguillas por espiga los componentes del rendimiento más afectados (Gillespie y Miller, 1984).

El girasol silvestre, *H. annuus*, se ha naturalizado en la región central argentina entre puntos extremos ubicados en la localidad de Puán (Buenos Aires) al sur, Diamante (Entre Ríos) al noreste y Media Agua (San Juan) al oeste (Poverene *et al.*, 2002). La distribución de esta especie silvestre se superpone ampliamente con la región donde se cultiva girasol, con el que puede cruzarse y originar plantas híbridas con buena aptitud reproductiva (Ureta *et al.*, 2008).

Estos genotipos silvestres podrían invadir lotes de girasol cultivado y causar mermas en el rendimiento.

A su vez, no sólo puede verse afectado el rendimiento en grano del cultivo sino también la calidad del mismo. En el caso del girasol, el pericarpio no tiene la misma composición que la semilla ya que el primero está determinado solamente por el genoma materno mientras que el aceite de la semilla incluye el efecto de los genes que provienen del polen. Es así que la composición de aceite de la semilla cosechada de un híbrido de girasol cultivado puede ser distinta de la que le dio origen, ya que puede haber habido una alteración por polen extraño (Bervillé, 2010). En Argentina, un estudio realizado sobre nueve poblaciones silvestres de *H. annuus* mostró que las poblaciones tuvieron en promedio 24% de materia grasa con una considerable variabilidad en el contenido de ácidos esteárico, palmítico, linoleico y oleico (Cantamutto *et al.*, 2008b). Es así que la presencia de girasol silvestre en un lote de girasol podría afectar el rendimiento en grano y también el contenido y calidad de materia grasa por flujo de polen.

En nuestro país no se han encontrado registros sobre interferencia de *H. annuus* silvestre en los cultivos. Sin embargo, durante 2009 y 2010, se relevaron casos de girasol con malezas del género *Helianthus*. Se identificaron 31 lotes, 12 en 2009 y 19 en 2010. Más del 64% de los casos se encontraron en La Pampa, principalmente en los departamentos de Atreucó y Quemú Quemú, el 29% se hallaron en Buenos Aires principalmente en el partido de Salliqueló. Los dos lotes restantes se encontraron en Córdoba y San Luis. Los biotipos invasores pertenecían a *H. petiolaris*, *H. annuus* y cruzamientos entre estas especies (Tabla 4.1). Siete de los 31 lotes presentaron como maleza a *H. annuus* cuyos individuos se hallaron en forma aislada y en la mayoría de los casos las plantas estuvieron en la línea de siembra, sugiriendo una posible contaminación durante la producción de semilla.

Esos registros muestran que el girasol silvestre no sólo aparece en caminos vecinales y banquinas (Poverene *et al.*, 2002) sino que también puede invadir lotes de cultivos y potencialmente interferir sobre el cultivo de girasol.

Tabla 4.1: Ubicación y características del cultivo y la maleza en lotes de girasol domesticado invadidos por malezas del género *Helianthus* en la región central de Argentina.

Año	Partido, Departamento	Provincia	Cultivo			Maleza			
			Laboreo <sup>1</sup>	Plantas m <sup>-2</sup>	Estadio	Distribución	Clasificación <sup>2</sup>	Ubicación <sup>3</sup>	individuos (n)
2009	Salliqueló	Buenos Aires	LM	5,7 ± 1,2	R7	total	PET	T	>300
2009	Tres Lomas	Buenos Aires	LM	5,7 ± 0,5	R8	aisladas	CRUZA	T	≤10
2009	Tres Lomas	Buenos Aires	LM	5,7 ± 1,1	R9	parches	CRUZA	T	10-50
2009	Atreucó	La Pampa	L0	2,1 ± 1,4	R6	parches	PET	T	50-300
2009	Atreucó	La Pampa	LC	4,0 ± 0,8	R7	total	SEG	T	10-50
2009	Catrilo	La Pampa	L0	4,6 ± 0,8	R7	total	CRUZA	T	50-300
2009	Quemú Quemú	La Pampa	LC	3,6±0,7	R6	aisladas	ANN	T	10-50
2009	Maraco	La Pampa	LM	5,5 ± 2,3	R7	aisladas	ANN	L	≤10
2009	Maraco	La Pampa	L0	4,7 ± 1,0	R6	aisladas	CRUZA	T	≤10
2009	Maraco	La Pampa	LC	4,3 ± 1,5	R7	aisladas	ANN	L	≤10
2009	Quemú Quemú	La Pampa	LM	3,5 ± 1,1	R6	parches	PET	T	50-300
2009	Quemú Quemú	La Pampa	L0	3,6 ± 0,8	R6	parches	PET	T	>300
2010	Carhué	Buenos Aires	LM	1,9 ± 1,6	R8	parches	PET	T	>300
2010	Guaminí	Buenos Aires	L0	3,9 ± 1,9	R7	aisladas	PET	T	10-50
2010	Salliqueló	Buenos Aires	LM	4,5 ± 2,4	R6	parches	PET	T	50-300
2010	Salliqueló	Buenos Aires	LM	5,8 ± 0,7	R6	parches	PET	T	>300
2010	Salliqueló	Buenos Aires	LM	4,8 ± 0,8	R6	parches	PET	T	50-300
2010	Trenque Lauquen	Buenos Aires	LM	4,7 ± 1,1	R8	aisladas	CRUZA	T	≤10
2010	General Roca	Córdoba	LM	3,1 ± 1,2	R9	aisladas	ANN	L	≤10
2010	Atreucó	La Pampa	L0	3,1 ± 1,9	R6	total	CRUZA	T	>300
2010	Atreucó	La Pampa	LC	4,3 ± 1,3	R3	aisladas	ANN	T	≤10
2010	Atreucó	La Pampa	LM	2,5 ± 1,6	R8	total	PET	T	>300
2010	Catrilo	La Pampa	L0	6,5 ± 1,3	R6	parches	SEG	T	10-50
2010	Catrilo	La Pampa	LM	3,7 ± 1,9	R6	total	PET	T	>300
2010	Chapaleufú	La Pampa	LM	5,9 ± 1,2	R8	aisladas	PET	T	≤10
2010	General Pico	La Pampa	LM	8,6 ± 0,9	R5	aisladas	CRUZA	T	≤10
2010	Quemú Quemú	La Pampa	L0	5,0 ± 1,0	R3	aisladas	ANN	T	≤10
2010	Quemú Quemú	La Pampa	L0	4,8 ± 0,7	R8	aisladas	CRUZA	T	≤10
2010	Quemú Quemú	La Pampa	L0	1,7 ± 1,4	R2	parches	PET	T	>300
2010	Realicó	La Pampa	L0	6,5 ± 0,8	R7	aisladas	ANN	L	≤10
2010	Gobernador Dupuy	San Luis	LM	4,8 ± 1,5	R6	aisladas	CRUZA	T	≤10

<sup>1</sup>LC: labranza convencional, LM: labranza mínima, L0: labranza cero. <sup>2</sup>PET: *H. petiolaris*, ANN: *H. annuus*, CRUZA: individuos con características intermedias entre las especies, SEG: descendientes de un girasol cultivado. <sup>3</sup>T: distribuidas en todo el lote, L: distribuidas en la línea de siembra.

En febrero de 2009, se identificó un lote de girasol (S 38° 16', W 60°07') en cercanías a la localidad de Barrow (partido de Tres Arroyos, Buenos Aires), que no contaba con registro de presencia de materiales silvestres (Ing. Agr. Pablo Errazu, Mitikile S.A., *com. pers.*). El lote era de aproximadamente 45 ha, con 5 ha invadidas por plantas ferales de *H. annuus*, como maleza predominante. Dado que esta situación no registraba antecedentes en el país (Poverene *et al.*, 2008) se consideró como un estudio de caso. Como hipótesis de trabajo se planteó que la producción de grano y aceite disminuiría por interferencia de las plantas de girasol maleza y que esta disminución estaría relacionada con la densidad de la maleza en el cultivo. El objetivo del trabajo fue estimar la disminución del rendimiento y la calidad de aceite por efecto de la interferencia de malezas del género *Helianthus*.

## **MATERIALES Y METODOS**

Dentro del sector invadido, el 04/03/09, estando el cultivo en R8 (Schneiter y Miller, 1981) se estimó la densidad de malezas (n=10) utilizando un sistema semi-cuantitativo. La abundancia de las malezas se calculó agrupándolas en tres categorías: baja, menos de 4 malezas m<sup>-2</sup>; mediana, entre 5 y 19 malezas m<sup>-2</sup> y elevada: más de 20 malezas m<sup>-2</sup>. Las estimaciones se realizaron sobre círculos de 2 m de radio alrededor del observador a lo largo de una transecta en forma de "W" (Clay y Johnson 2002) dispuesta en el sector invadido. Se caracterizaron plantas ferales de *H. annuus* representativas mediante 12 descriptores fenotípicos (USDA 2010). El 17/03/09 en madurez para cosecha se delimitaron 30 parcelas de 1 m<sup>2</sup> ubicadas al azar sobre dos transectas paralelas de 200 m separadas 5 m, a 30° de la línea de siembra, en dirección NE-SW. Se evaluó la densidad, diámetro de capítulo, producción por planta de cultivo y maleza, cosechando únicamente capítulos maduros que fueron trillados manualmente. La proporción de granos vanos, llenos, peso medio y número de granos por capítulo fue estimada sobre una fracción representativa de la parcela utilizando un divisor de muestras. El rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>) se determinó pesando la totalidad de granos llenos por parcela.

Se separaron los frutos de las malezas en dos submuestras, realizando 20 movimientos en vaivén con una zaranda de orificios rectangulares (2 x 20 mm) por los cuales no atravesaban los frutos del girasol cultivado. Se determinó el peso de los frutos sobre ambas submuestras. Se estimó el número de cipselas bajo zaranda pesando 400 semillas.

Para el cálculo de rendimiento cosechado se consideró el rendimiento en grano del cultivo más la proporción de granos de maleza que quedaron sobre zaranda. La información fue agrupada en tres categorías de acuerdo a la densidad de la maleza: 0 a 1, 2 a 3 y más de 3 plantas por metro cuadrado.

Se tomaron muestras representativas de 25 g de granos de girasol cosechado y de la maleza cosechada sobre zaranda para las tres categorías con tres repeticiones para cada caso. En los mismos, se determinó la materia grasa mediante resonancia magnética nuclear y perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. Los análisis fueron realizados en la Cámara Arbitral de Cereales de Bahía Blanca.

Para el cálculo de la materia grasa y el contenido de ácidos grasos de las parcelas, se utilizó la misma metodología que para el cálculo del rendimiento cosechado. La cantidad y calidad de aceite de la parcela se expresó teniendo en cuenta el aporte de los granos de la maleza en función de las tres categorías propuestas.

La declinación de la densidad poblacional de semillas en el banco del suelo se estimó realizando una simulación del peor escenario. La densidad inicial correspondió a la semilla recolectada bajo zaranda, que es la que caería al suelo. Para el cálculo se asumió que la mortandad inicial del 83% aparecía solo en el primer año, y que la proporción de semillas dormidas observada en la primera primavera, que era del 47%, se mantenía en los años siguientes. Además en el modelo se consideró que se eliminaba la totalidad de las plantas antes de la fructificación por lo que no había nuevos aportes al banco del suelo.

Se realizó análisis de componentes principales y ANOVA, agrupando las observaciones de acuerdo a las categorías propuestas, 0 a 1, 2 a 3 y más de 3 plantas por metro cuadrado (INFOSTAT 2008). Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

El cultivo de girasol presentaba una densidad adecuada para la región, entre  $4,9 \pm 1,3$  plantas  $m^{-2}$ . Las malezas que presentaban baja predominancia (1) fueron *Datura ferox* “Chamico”, *Chenopodium album* “Quinoa”, *Xanthium spinosum* “Abrojo chico”, *Cynodon dactylon*

“Gramón” y *Solanum sisymbriifolium* “Espina colorada”. Por su parte, las plantas ferales de *H. annuus* alcanzaron hasta 11 plantas m<sup>-2</sup> en los parches más densos.

Las plantas invasoras presentaron caracteres morfológicos intermedios entre *H. annuus* silvestre y domesticado (Seiler y Rieseberg, 1997), altura menor o igual a 3,0 m, ramificación apical o total de la planta, varios capítulos pequeños, antocianinas en tallo y estructuras florales (Tabla 4.2, Figura 4.1). En baja proporción algunos individuos mostraron androesterilidad.

Tabla 4.2: Rasgos distintivos entre el cultivo de girasol y la maleza del mismo género en Barrow (Buenos Aires).

CARACTERES	GIRASOL	MALEZA
Densidad (plantas m <sup>-2</sup> )	4,9 ± 1,3	4,3 ± 3,0
Altura (m)	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,3
Antocianinas	no	Si
Ramificación	sin	total,apical
Hojas (n)	32,0 ± 2,0	44,0 ± 9,6
Capítulo (n)	1	25 ± 10
Diámetro capítulo (cm)	16 ± 2,1	6,6 ± 0,9
Peso de 1000 granos (g)	41,8 ± 8,6	12,8* ± 4,8
Rendimiento planta (g)	76,5 ± 19,7	11,3 ± 8,1

\*peso de semillas que pasaron por zaranda de orificios rectangulares (2x20 mm)

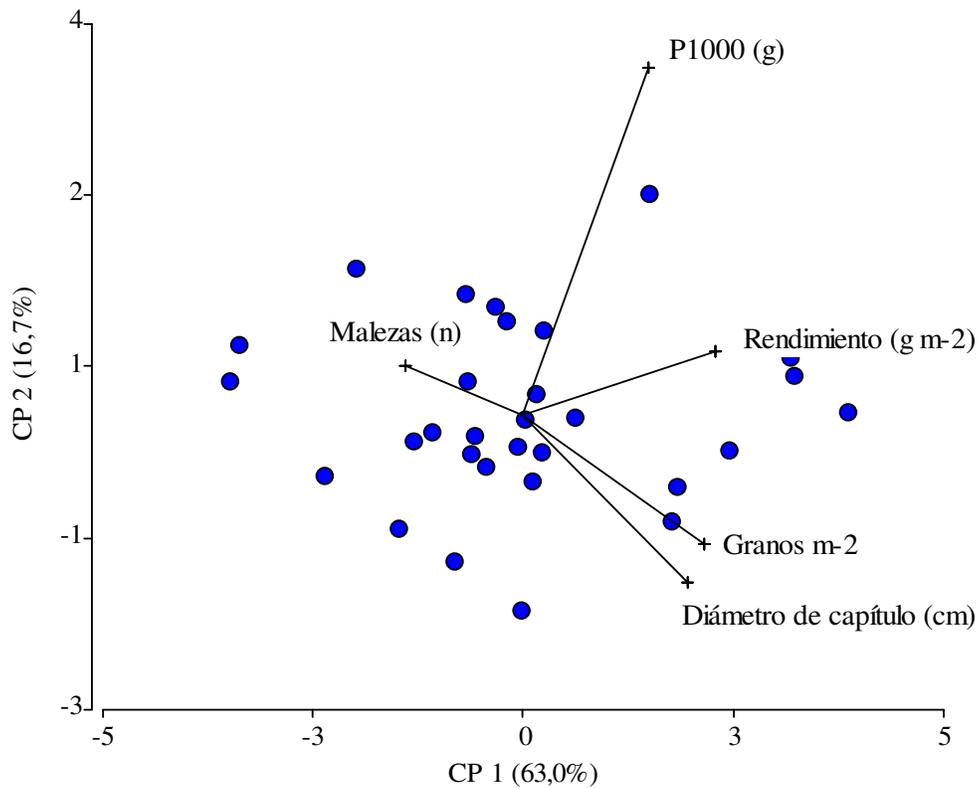
La matriz de correlaciones obtenida del análisis de componentes principales mostró que el aumento de la densidad de plantas de la maleza disminuyó el rendimiento del cultivo ( $r = -0,48^{**}$ ). Además, se encontró que el diámetro de capítulo ( $r = 0,70^{**}$ ), número de granos llenos ( $r = 0,89^{**}$ ) y el peso de los granos ( $r = 0,69^{**}$ ) se correlacionaron con el rendimiento del cultivo (Figura 4.2).

Los caracteres que intervinieron mayormente para explicar el 63% del componente 1 fueron el rendimiento de la parcela (0,96), el número de granos llenos (0,90) y el diámetro de capítulo (0,82). Por otro lado, el componente 2 estuvo mayormente explicado por el peso de 1000 granos (0,77).

Figura 4.1: Detalle de una planta feral de *Helianthus annuus* (izquierda) y vista general del lote invadido de girasol (derecha).

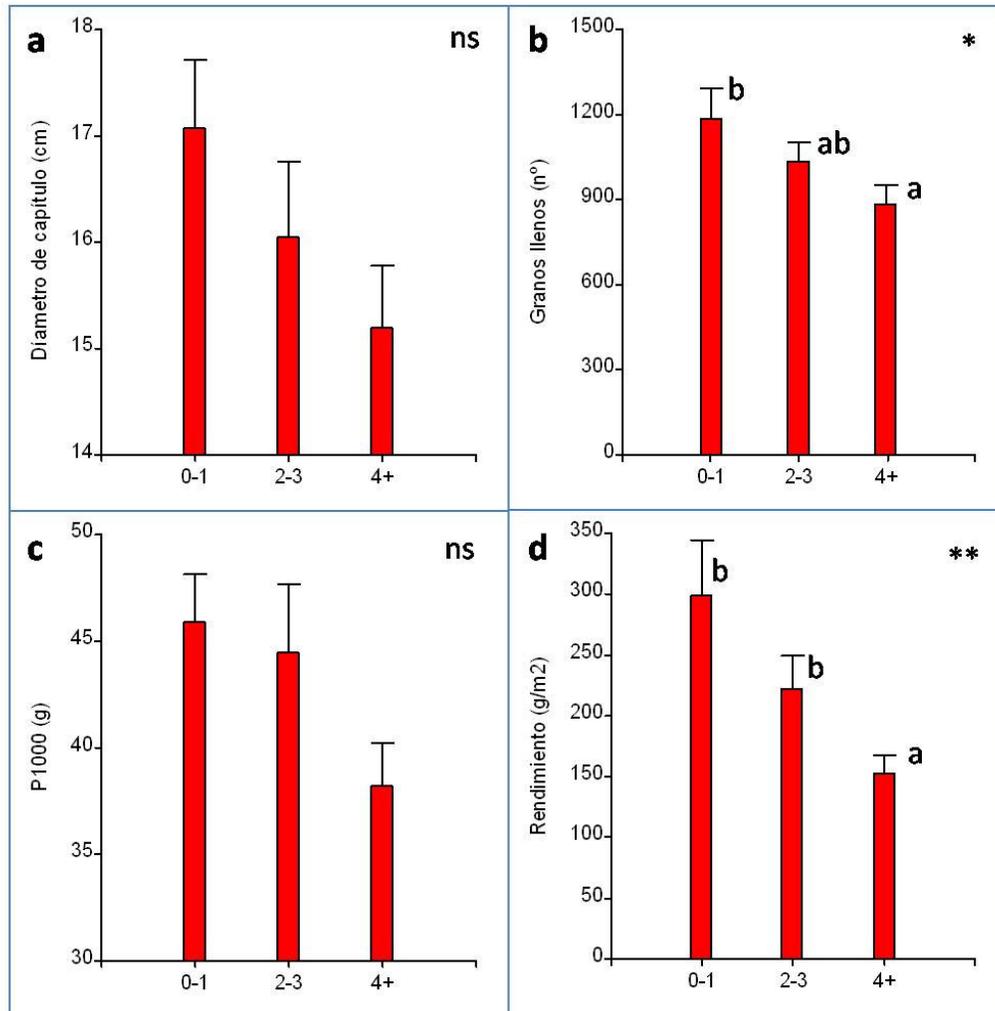


Figura 4.2: Análisis de componente principales en un lote de girasol invadido (Barrow, Buenos Aires). Los vectores corresponden a las variables más explicativas.



De acuerdo a las categorías propuestas, el ANOVA mostró una merma del 25% en el número de granos por capítulo y del 49 % en el rendimiento para densidades de maleza mayores a 3 pl.m<sup>-2</sup>. Si bien no fue significativo, el diámetro de capítulo y la biomasa por grano también disminuyeron con el incremento de la densidad de maleza (Figura 4.3). La cosecha se incrementó levemente por el aporte de los granos de la maleza retenida por la zaranda, igualmente las parcelas con mayor número de plantas invasoras fueron significativamente las de menor rendimiento.

Figura 4.3: Diámetro del capítulo (a), granos llenos (b), P1000 (c) y rendimiento (d) para tres grupos de stand de plantas ferales de *H. annuus*. ns, \*,\*\* : significación del ANOVA. 0-1: hasta 1 planta de maleza m<sup>-2</sup>, 2-3: hasta 3 plantas de maleza m<sup>-2</sup> y 4+: 4 o más plantas de maleza m<sup>-2</sup>.



Letras por encima de la media indican diferencias según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), las barras verticales muestran el error estándar.

El aporte de la maleza al rendimiento del lote aumentó con la densidad de plantas ferales, alcanzando 220 kg ha<sup>-1</sup> con más de 3 plantas m<sup>-2</sup>. Por otro lado, las cipselas que pasaron la zaranda se incorporaron al banco del suelo alcanzando las 1127 ± 676 cipselas m<sup>-2</sup>. También se observó una relación lineal entre número de capítulos y cipselas dispersadas ( $r = 0,92^{**}$ ).

El análisis de la materia grasa y el perfil de ácidos grasos de las muestras de la maleza y el cultivo según las tres categorías establecidas no mostró un efecto significativo de la

densidad de la maleza sobre la cantidad y calidad de la materia grasa. Sin embargo, el contenido de materia grasa y de ácidos grasos linoleico y oleico fue significativamente diferente entre el cultivo y la maleza. El cultivo tuvo un mayor contenido de materia grasa, ácido oleico y menor contenido de ácido linoleico que la maleza (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Materia grasa (%) y perfil de ácidos grasos del cultivo y la maleza en un lote de girasol ubicado en cercanías a la localidad de Barrow (Buenos Aires).

	Materia grasa		Ácidos grasos			
	(%)	Estearico (%)	Palmítico (%)	Linoleico (%)	Linolenico (%)	Oleico (%)
Cultivo	45,6 b	4,7	6,2	61,4 a	0,1	27,0 b
Maleza	39,6 a	4,5	6,3	65,1 b	0,1	22,3 a
ANOVA						
Genotipo (g)	**	ns	ns	**	ns	**
Densidad (d)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
g x d	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

El aumento de densidad de la maleza disminuyó el rendimiento y alteró la cantidad y calidad de la materia grasa cosechada, ya que se recolectó una proporción de granos de la maleza junto con los granos del cultivo. Cuando la densidad de la maleza fue superior a 3 plantas  $m^{-2}$ , la cosecha disminuyó un 43% y la materia grasa un 0,6%. El perfil de ácidos grasos también varió, ya que con las densidades mayores, el ácido linoleico aumentó un 0,4% y el ácido oleico disminuyó en la misma proporción (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Relación cultivo:maleza cosechado (C:M), rendimiento cosechado (RC), materia grasa (MG), ácidos grasos linoleico y oleico en un lote de girasol cultivado (Barrow, Buenos Aires) en función de densidades crecientes de plantas ferales de *Helianthus annuus*.

Maleza (plantas $m^{-2}$ )	C:M	RC (g $m^{-2}$ )	MG (%)	Linoleico (%)	Oleico (%)
0-1	35:1 b	305,7 ± 45,6 b	45,4 ± 0,0 b	61,5 ± 0,1 a	26,9 ± 0,1 b
2-3	17:1 b	234,1 ± 30,3 ab	45,3 ± 0,0 ab	61,6 ± 0,1 ab	26,8 ± 0,1 ab
+4	6:1 a	173,0 ± 13,4 a	44,8 ± 0,1 a	61,9 ± 0,1 b	26,4 ± 0,2 a

Medias ± error estándar seguidas por letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La morfología de las plantas maleza coincidió con la descripción botánica de *H. annuus* silvestre (Seiler y Rieseberg, 1997). Sin embargo, algunos de los caracteres relevados, como diámetro de capítulo mayor a 5 cm, presencia de androesterilidad, plantas con capítulo principal, muestran indicios de hibridación con el girasol cultivado. A su vez, el porcentaje de materia grasa detectado en las plantas de la maleza (Tabla 4.4) fue considerablemente superior al hallado en poblaciones silvestres de *H. annuus*, que arrojaron valores menores al 27% (Seiler, 1983; Cantamutto *et al.*, 2008b). Esta diferencia en la materia grasa entre los genotipos silvestres y la maleza encontrada en Barrow también indicaría hibridación con el girasol cultivado.

La maleza se encontró en una región en donde no se han naturalizado poblaciones silvestres de *H. annuus* (Poverene *et al.*, 2002; Poverene *et al.*, 2008). Esto podría indicar que el foco inicial de invasión provino de semilla contaminada en lotes de producción o de semilla de genotipos silvestres transportada por maquinaria agrícola contratada. Los medios de transporte agrícolas, como los camiones, han sido reconocidos como una importante fuente de contaminación en Japón en donde han encontrado poblaciones ferales de *Brassica napus* genéticamente modificada en un país en donde la única forma de ingreso de esta especie ha sido a través de la importación de semilla con fines alimenticios (Kawata *et al.*, 2009). En nuestro país la situación sería aún más riesgosa ya que la utilización de maquinaria contratada ha crecido en la última década siendo utilizada por el 47% de los establecimientos agropecuarios (Piñeiro y Villareal, 2005; Cantamutto *et al.*, 2010a).

Las malezas en alta densidad disminuyeron el rendimiento en grano del cultivo en aproximadamente el 50% (Figura 4.3). Este es el primer lote hallado en nuestro país con niveles tan elevados de girasol silvestre como maleza y con efectos significativos sobre el cultivo de girasol. En algunos casos, cruzamientos entre la especie silvestre y el cultivo han determinado un aumento de la invasividad. Tal es el caso del *Sorghum halepense* que parece haber aumentado su agresividad en EEUU debido a la introgresión de caracteres del sorgo cultivado (Harlan, 1992). El flujo génico desde el cultivo ha aumentado la agresividad en especies silvestres emparentadas con siete de los 13 cultivos más importantes del mundo: trigo, arroz, soja, sorgo, mijo, poroto y girasol

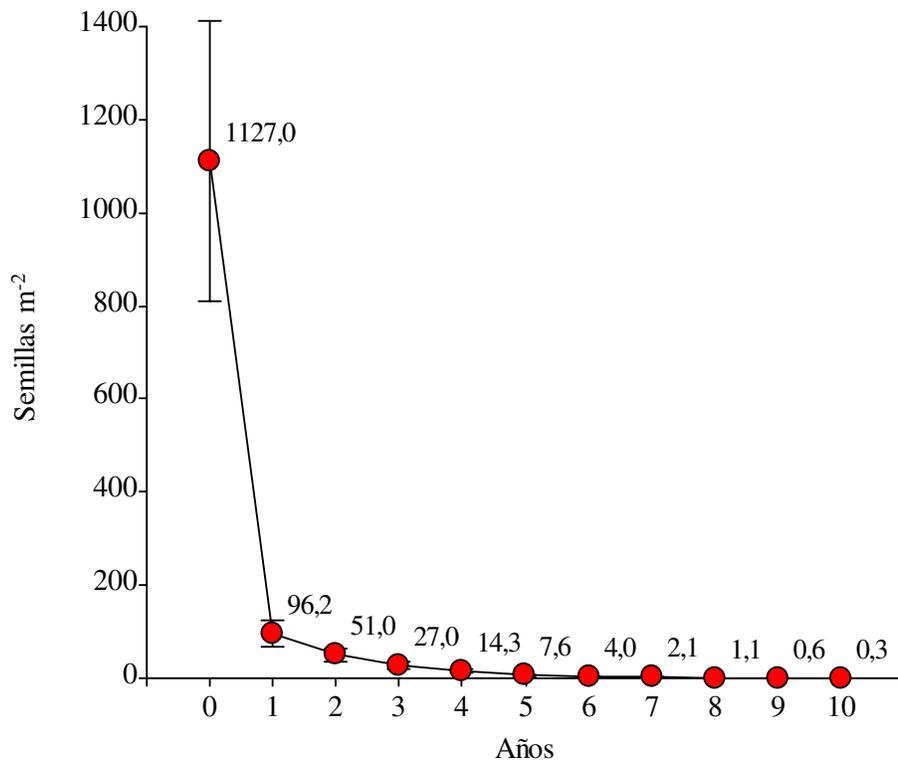
(Ellstrand et al., 1999). En esos casos, la evolución de la especie silvestre estuvo condicionada a la hibridación con el cultivo, la persistencia y reproducción de los híbridos, y alelos de la especie cultivada le confirieron una ventaja adaptativa. Las primeras dos etapas se demostraron en el presente trabajo, restaría investigar los caracteres del cultivo que aumentaron la invasividad de la especie silvestre. La expresión de genes resultó ser diferente en poblaciones silvestres de *H. annuus* colectadas en campo natural y biotipos maleza colectados en lotes de maíz, donde la tasa de crecimiento de plántulas duplicó a las silvestres (Lai et al., 2008). Según esos autores, la causa sería el costo de la tolerancia a estrés biótico y abiótico en las poblaciones silvestres. Sin embargo, no encontraron un patrón común en todas las malezas debido a diversas condiciones ambientales locales (clima, suelo, patógenos, manejo) que han participado en la evolución.

Las malezas en alta densidad causaron mermas en el rendimiento y alteración en la cantidad y calidad de aceite por mezcla física. La calidad no se vio alterada por el flujo de polen proveniente de las plantas de *H. annuus* silvestre, posiblemente debido a que la mayoría de las plantas del cultivo y la maleza no coincidieron en su período de floración. Además de afectar el rendimiento en grano y materia grasa del cultivo se observó que mientras el cultivo se encontraba en condiciones de ser cosechado, las plantas de la maleza permanecían aún verdes (Figura 4.1). Esta diferencia entre el ciclo del cultivo y la maleza dificultaría la cosecha mecánica, la cual debería ser postergada hasta que las plantas malezas se hayan secado.

Si bien una parte de las semillas de la maleza fueron cosechadas junto a los granos del cultivo, una fracción ( $1127 \pm 676$  semillas  $m^{-2}$ ) cayó al suelo. Estas semillas serían la fuente de invasión en las próximas generaciones. Estas semillas han mostrado una fuerte dormición (Capítulo 1) y pueden permanecer viables luego de haber sido almacenadas durante 20 años a temperatura ambiente (Seiler 2009). Para el caso de estudio, las semillas presentaron una elevada mortandad (83%) en la primavera posterior a la dispersión y el 47% de dormición. Una dormición similar se observó la segunda primavera luego de la dispersión (M. Casquero, *com. pers.*). En el peor escenario, si se controlaran las plantas para que no fructifiquen, sólo luego de 10 años el nivel de semillas del banco del suelo sería cercano a cero (Figura 4.4). Probablemente, este período se reduciría bajo condiciones de labranza cero ya que al no enterrar las semillas,

estas quedarían expuestas a predadores, condiciones ambientales más variables (potencial daño de la semilla por humedecimiento y secado) y luz, que promueve la germinación (Alexander y Schrag, 2003).

Figura 4.4: Estimación de la densidad máxima de semillas activas (semillas  $m^{-2}$ ) en el banco del suelo a partir de la dispersión inicial observada en el lote de Barrow y la dormición del primer año. Se consideró que no se produjeron nuevos aportes de semillas, una mortandad inicial del 83% y que la dormición inicial del 47% se mantuvo durante todo el período simulado. Los valores sobre los puntos indican el número de semillas activas  $m^{-2}$  en cada año.



Estos resultados muestran que las formas invasoras de *H. annuus* que aparecen en ambientes no colonizados por las especies silvestres presentarían gran capacidad de interferencia sobre el cultivo de girasol. De ello emerge la necesidad de prevenir su ingreso a los lotes de producción debido a su alta capacidad de interferencia.

## **Capítulo 5 : HÍBRIDOS DE GIRASOL CULTIVADO-SILVESTRE: IDENTIFICACION Y RIESGOS**

Las variedades modernas de girasol se siembran mayormente como híbridos, siendo este el segundo cultivo después del maíz, en utilizar masivamente esta tecnología. Europa y Sudamérica son responsables de más de las tres cuartas partes de la producción mundial de aceite de girasol (Jan y Seiler, 2007; USDA, 2010).

Se reconoce que la hibridación cultivo-silvestre es un importante proceso biológico implicado en el origen y evolución de varias malezas nocivas (Harlan, 1992; Ellstrand, 2003). Cuando los cultivos domesticados comparten ambientes con sus parientes silvestres y no existen barreras reproductivas, aumenta el riesgo de la evolución de la maleza. Se sospecha que el sorgo de alepo (*Sorghum halepense*), una de las peores malezas agrícolas, surgió de una hibridación entre el sorgo cultivado, *S. bicolor* y la especie silvestre *S. propinquum* (Paterson *et al.*, 1995). A pesar de que la polinización entre el cultivo y el sorgo de alepo es infrecuente, los cruzamientos podrían ocurrir cuando hay plantas cultivadas androestériles (Arriola y Ellstrand, 1996; Dweikat, 2005). El flujo de polen desde el sorgo de alepo hacia líneas androestériles es una fuente potencial de contaminación durante la producción de semilla de sorgo comercial (Baker, 1974). Esto proporcionaría una manera de difundir el sorgo invasor y ha recibido poca atención en la literatura científica. La cosecha de girasol puede ser contaminada por sus parientes silvestres debido a la coexistencia de girasol cultivado y girasol silvestre o maleza, no sólo en América del Norte, sino también en otras regiones del mundo.

El girasol, *Helianthus annuus*, es una especie originaria de América del Norte, donde sus antepasados silvestres crecen a lo largo de áreas extensas de EEUU, Canadá y México. Los girasoles silvestres crecen a lo largo de carreteras, arroyos y a veces invaden campos agrícolas. Como un invasor no nativo, los girasoles silvestres son adventicios en diferentes regiones del mundo, incluyendo las principales regiones productoras de girasol de Francia, Italia, Serbia, España y Argentina (Faure *et al.*, 2002; Poverene *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2006; Vischi *et al.*, 2006; Stanković-Kalezić *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2009).

El girasol silvestre *H. annuus* es una maleza que puede provocar severas reducciones del rendimiento en maíz, trigo y sorgo (Geier *et al.*, 1996, Rosales-Robles *et al.*, 2002, 2005; Mesbah *et al.*, 2004; Deines *et al.*, 2004). Debido a su invasividad, tolerancia a herbicidas y competitividad, Buhler y Parochetti (2010) han elegido a *H. annuus* como modelo para analizar la dinámica poblacional de las malezas y calcular pérdidas económicas mediante herramientas informáticas (WeedSOFT). Además de su competitividad, también puede disminuir potencialmente la calidad de la cosecha de girasol, dado que *H. annuus* silvestre tiene menos 270 g kg<sup>-1</sup> de contenido de aceite (Seiler, 1983).

Después de varios intentos para desarrollar una clave taxonómica precisa para diferenciar entre diferentes subespecies de *H. annuus*, Heiser (1978) llegó a la conclusión de que estas taxa están mejor caracterizados por su hábito y nicho ecológico, que por su morfología. *H. annuus* silvestre tiene crecimiento indeterminado y ramificación y produce varios capítulos durante un extenso período de floración. Este hábito indeterminado crea un largo período de liberación de polen, aumentando el riesgo de contaminación en los campos de producción de semillas híbridas, cuando las poblaciones silvestres están presentes en las áreas vecinas (Smith, 1978).

En Argentina, el girasol silvestre proporciona un escenario único para estudiar la relación cultivo-silvestre. Después de su introducción antes de 1960, el girasol silvestre colonizó la región central del país, moviéndose gradualmente a través de ambientes bien definidos (Cantamutto *et al.*, 2010a). El proceso de invasión ha estado probablemente relacionado con la aparición de nuevas mutaciones, flujo génico y recombinación suficiente como para mantener y recrear una gran variabilidad intraespecífica, comparable a la que se encuentra en el centro de origen (Cantamutto *et al.*, 2010b). El flujo génico entre girasol silvestre y domesticado se ha confirmado en varios ambientes nativos y invadidos (Arias y Rieseberg, 1995; Massinga *et al.*, 2003; Burke *et al.*, 2002; Ureta *et al.*, 2008).

El riesgo de contaminación con especies silvestres emparentadas en la producción de semillas de girasol excluye a varias regiones del mundo. En Europa, Turquía es preferido para la producción de semillas, ya que se considera libre de girasoles silvestres (Berville *et al.*, 2005). En Argentina, la producción de semillas de girasol se ha

desplazado hacia la zona del valle bonaerense del Río Colorado, donde se están tomando las precauciones para evitar la invasión de especies silvestres del género *Helianthus* (Cantamutto *et al.*, 2008c). Müller *et al.* (2006, 2009) sugirieron que las poblaciones ferales de girasol de España y Francia podría haber evolucionado de híbridos cultivo-silvestre introducidos involuntariamente con semillas de girasol importados de las áreas de producción donde estuvieron presentes los girasoles silvestres. Este escenario significaría que las plantas fuera de tipo mediante autofecundación o polinización entre hermanas podrían constituir una población de girasol maleza.

Los reglamentos internacionales de semillas aceptan hasta un 5% de impurezas botánicas en semillas certificadas. La producción de semillas de girasol requiere un aislamiento total de cualquier fuente posible de polen indeseable para prevenir la contaminación en parcelas de producción de semillas. Las distancias de aislamiento deben ser de al menos 0,5 km para las semillas certificadas y hasta 1,5 km para producir líneas parentales de semilla híbrida (OECD, 2007).

El riesgo potencial de contaminación de polen por las especies invasoras preocupa a las empresas de producción de semillas. Las plantas fuera de tipo que surgen durante la producción de semilla híbrida son eliminadas cuidadosamente por técnicos altamente capacitados (Anfinrud, 1997), pero no está claro si los híbridos cultivo-silvestre podrían ser identificados fácilmente por los agricultores en sus campos de girasol. Tampoco está claro si bajo condiciones de gran cultivo, las plantas fuera de tipo podrían evolucionar hacia poblaciones de girasol maleza. Si plantas fuera de tipo fueran difíciles de distinguir del girasol domesticado, existiría de riesgo de un proceso invasivo de contaminación de semillas. Si el fenotipo silvestre se recuperara en unas pocas generaciones bajo condiciones de agricultura, se facilitaría el proceso de invasión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se simuló la contaminación en la producción de semillas de girasol por medio de cruzamientos controlados, a través de polinización manual, entre líneas endocriadas e individuos de poblaciones silvestres de girasol. El germoplasma silvestre estuvo representado por muestras ( $n > 30$ ) de cinco poblaciones silvestres de *H. annuus* invasoras recolectadas en diferentes ecorregiones del país; Rio Cuarto (RCU); Colonia Barón (BAR); Adolfo Alsina (AAL); Diamante (DIA) y Las Malvinas (LMA). Las líneas endocriadas androestériles (CMS) HA89, A10 y A09 fueron utilizadas como parental femenino. La primera es una de las líneas puras más ampliamente utilizadas a nivel mundial, mientras que las otras dos fueron desarrolladas por el EEA INTA Manfredi. Los híbridos comerciales DK3820, DK4050, DK3845 OIL PLUS y la variedad de polinización libre cv. Antilco se utilizaron como controles. Cada población, línea consanguínea y el híbrido comercial fueron considerados biotipos diferentes.

Cada línea endocriada fue cruzada con cada población silvestre para crear cinco diferentes biotipos cultivo-silvestre (F1). Cada biotipo F1 fue cruzado por plantas hermanas para obtener plantas F2. Al menos 20 plantas de la generación F1 fueron utilizadas como polinizadoras para fecundar a las líneas endocriadas y crear la primera retrocruza (BC1). Las plantas de la segunda retrocruza (BC2) se obtuvieron utilizando plantas R1 como polinizadores de las líneas endocriadas HA89 y A10.

Los biotipos fueron cultivados en un jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, durante las temporadas de 2005 a 2007. Para romper la dormición, las semillas fueron colocadas sobre papel absorbente en una cámara húmeda a 5°C durante una semana (ISTA, 2004). Posteriormente, las semillas se sembraron en bandejas de plástico de 28 x 54 cm (200 celdas) con sustrato comercial. Las plantas fueron criadas por 30 días en invernadero bajo luz natural a 20-25°C y luego fueron transplantadas al campo. Se hicieron determinaciones sobre 177 plantas F1, 115 F2, 150 BC1, 50 BC2, 45 líneas endocriadas (LE), 40 de girasol cultivado (SUN) y 162 individuos de poblaciones silvestres de *H. annuus* (SIL).

## **Caracterización fenotípica**

La caracterización fenotípica se basó en 45 descriptores, 22 caracteres cuantitativos y 23 cualitativos. Se realizaron observaciones generales de la estructura de la planta y la ramificación de acuerdo a Hockett y Knowles (1970). Entre los rasgos cuantitativos de plantas individuales fueron altura de planta (cm), diámetro de tallo a mitad de planta (cm), ángulo de inclinación del capítulo (°), número de hojas, número de capítulos. El Ancho y largo de hoja (cm) y relación ancho/largo de peciolo (cm) se determinó en hojas de primer orden en la etapa de floración. Los rasgos cualitativos incluidos fueron: presencia de capítulo principal, base de la hoja cuneada, forma de la hoja cordada, superficie de hoja plana, margen de la hoja dentado y antocianinas en tallo. Se determinaron en plantas individuales y se calcularon como frecuencia de cada conjunto de plantas (LE, SUN, F1, F2, BC1, BC2 y SIL) por biotipo. A nivel de población, el ciclo de vida fue calculado como días a comienzo de la floración a partir de trasplante (trasplante a 10% de las plantas en floración), comienzo a mediados (de 10 a 50% de la planta en floración) y ciclo total (trasplante a 90% de plantas sin flores).

Se midieron los siguientes rasgos cuantitativos que en un capítulo de primer orden: número de flores liguladas, ancho y largo de la lígula (cm), número de brácteas, ancho y largo de brácteas (cm), la relación largo/ancho de bráctea y diámetro de capítulo (cm). Se determinó la presencia de antocianinas en paleas y estigmas, flores rojas del disco y androesterilidad como frecuencias para cada conjunto de plantas por biotipo.

Los rasgos cuantitativos que se midieron sobre 50 cipselas fueron: largo (mm), ancho (mm), espesor (mm) utilizando una lupa con un aumento 10 X y calculados como un promedio de cada conjunto de plantas por biotipo.

BC1 y BC2 fueron incluidos para analizar la variabilidad morfológica en estos biotipos y el efecto del cruzamiento sobre la morfología de las plantas.

Con el objetivo de identificar caracteres morfológicos distinguibles en plantas híbridas producto de contaminación en lotes de producción de semilla, se compararon los datos cuantitativos para LE, SUN, F1 y SIL como en un diseño de bloques incompletos, teniendo en cuenta los valores de la planta individual como repeticiones y los años de la

evaluación como bloques. Para estimar los valores promedio de cada rasgo cuantitativo, el número desigual de plantas entre genotipos fue corregido utilizando una combinación lineal de los efectos del modelo utilizado en el ANOVA (LSMEANS) y comparado por prueba de Tukey-Kramer mediante procedimiento GLM de SAS (2002). Los valores medios de rasgos cuantitativos medidos a nivel de genotipo y frecuencia de rasgos cualitativos determinada cada temporada de crecimiento fueron analizados considerando biotipos como réplicas y los años de la evaluación como bloques. Se analizaron los datos cualitativos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Los datos cuantitativos del conjunto de plantas fueron analizados mediante análisis de componentes principales (ACP) sobre todos los biotipos. Para realizar la clasificación morfológica de los individuos, se realizó un análisis discriminante (AD) basando en datos cuantitativos y cualitativos de todos los biotipos. Para analizar la variabilidad de la F2 y su similitud con el biotipo SIL, se realizó un segundo AD considerando solamente los biotipos LE, SUN, F2 y SIL. Los datos fueron analizados mediante los paquetes estadísticos SAS (2002) e INFOSTAT (2008).

## **RESULTADOS**

Se detectaron diferencias altamente significativas entre LE, SUN, F1 y SIL para 33 caracteres mediante ANOVA y la prueba de Kruskal-Wallis. Los híbridos cultivo-silvestre de primera generación mostraron 14 caracteres intermedios entre las líneas puras y girasol silvestre y seis rasgos similares a las líneas endocriadas. Ocho rasgos de las plantas F1 fueron similares al girasol silvestre y tres rasgos fueron transgresivos. Largo del pecíolo, número de hojas, período de floración, pigmentación en tallo, palea, estigma y color del disco floral fueron similares al girasol silvestre, pero diferente de las líneas endocriadas y el girasol domesticado. Las plantas F1 tuvieron hojas más largas y anchas que las de las líneas endocriadas y el girasol silvestre, pero comparables al girasol domesticado (Tabla 5.1).

Las plantas F1 fueron 37% más altas que los materiales domesticados y con más de 10 capítulos por planta. Las plantas F1 tuvieron mayor número de hojas y pecíolos más largos. El diámetro de capítulo de las cruces fue 42% más pequeño, con brácteas más angostas y cortas, menor número de flores liguladas y más cortas que el girasol

cultivado. El tamaño de la semilla fue poco variable entre IL, SUN y la F1, pero las semillas F1 fueron más cortas y de menor espesor que aquellas de los materiales domesticados. El 70% de las plantas F1 fueron ramificadas, con ramificaciones en su mayoría apicales o basales. El 40% de las cruzas presentaron pigmentación en tallo y el 70% de las plantas antocianinas en pálea, estigma y flores del disco. Asimismo, las F1 presentaron en promedio 9,3% de plantas androestériles, aunque este porcentaje no fue estadísticamente diferente de la encontrada en girasol domesticado y silvestre. La floración en F1 y el ciclo de vida fueron 45 y 13% más extensos, respectivamente, que en girasol cultivado (Tabla 5.1).

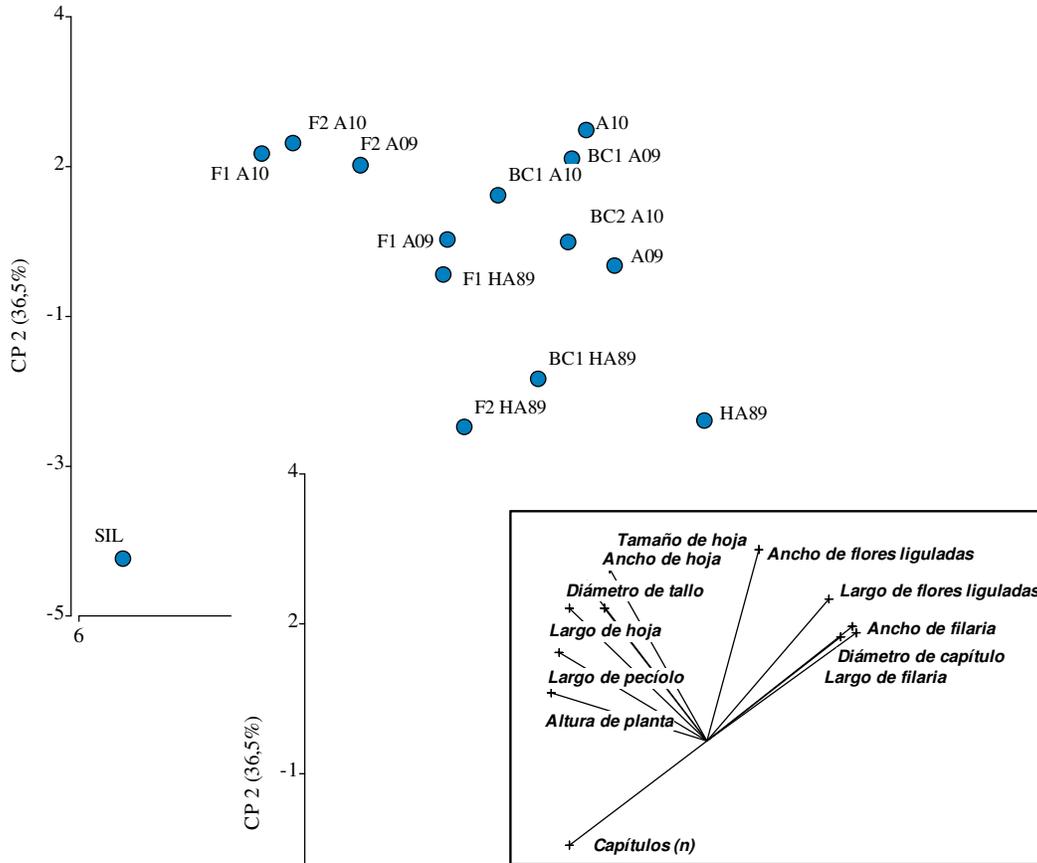
El análisis de componentes principales mostró que las plantas F1 fueron morfológicamente diferentes de las poblaciones silvestres de *H. annuus* y girasol cultivado (SUN). Las plantas F2 fueron similares a la F1, pero diferentes de las poblaciones de girasol silvestre. Las plantas de F2 HA89 fueron las que más se acercaron al girasol silvestre, pero igualmente estuvieron distantes de este. Las líneas endocriadas A09 y A10 y sus retrocruzas fueron similares a SUN, en tanto que HA89 y sus retrocruzas fueron diferentes. Las poblaciones silvestres difirieron de las plantas F1 y líneas endocriadas en el número y diámetro de capítulos, el número, ancho y largo de las flores liguladas y longitud de las brácteas (Figura 5.1).

Tabla 5.1: Características morfológicas de líneas endocriadas (LE), girasol silvestre (SIL), su progenie (F1) y el girasol cultivado (SUN). Rasgos en negrita diferencian a las plantas F1 de LE y SUN.

Nº	CARACTERES	LE	SUN	F1	SIL	Caracter en F1*
1	<b>Altura de planta (cm)</b>	120 a	131 a	208 b	237 c	I
2	diámetro de tallo (cm)	2,4 a	2,5 ab	2,5 ab	2,6 b	I
3	Inclinación de capítulo (°)	39 a	61 ab	63 b	90 c	I
4	<b>Capítulos (n)</b>	1a	1a	14 b	125 c	I
5	Ancho de hoja (cm)	22 a	27 b	27 b	23 a	T
6	Largo de hoja (cm)	22 a	26 bc	27 c	25 b	T
7	Tamaño de hoja (cm <sup>2</sup> )	501 a	714 c	740 c	591 b	T
8	<b>Largo de pecíolo (cm)</b>	16 a	16 a	20 b	20 b	S
9	Relación ancho/largo (5/8)	1,4 b	1,6 c	1,4 b	1,3 a	C
10	<b>Hojas (n)</b>	17 a	17 a	25 b	25 b	S
11	Flores liguladas (n)	36 b	47 c	34 b	28 a	C
12	Ancho de flores liguladas (cm)	2,0 b	2,2 c	2,0 b	1,3 a	C
13	<b>Largo de flores liguladas (cm)</b>	7,3 c	7,7 c	6,4 b	4,2 a	I
14	<b>Filarias (n)</b>	43 c	45 c	38 b	33 a	I
15	<b>Largo de brácteas (cm)</b>	4,9 c	6,2 d	4,2 b	2,2 a	I
16	<b>Ancho de brácteas (cm)</b>	2,6 c	3,4 c	2,0 b	0,8 a	I
17	Relación largo/ancho (15/16)	1,9 a	2,0 ab	2,2 b	2,7 c	I
18	<b>Diámetro de capítulo (cm)</b>	14,9 c	17,8 c	10,3 b	4,4 a	I
19	Días a 10% de floración (n)	62 a	72 b	60 a	60 a	C,S
20	10% a 50% de floración (n)	9 b	6 a	11 c	12 c	S
21	Ciclo total (n)	89 a	94 a	108 b	129 c	I
22	<b>Largo de cipsela (mm)</b>	11,5 d	10,8 c	10,4 b	6,0 a	I
23	Ancho de cipsela (mm)	5,7 b	6,3 c	5,6 b	3,1 a	C
24	<b>Espesor de cipsela (mm)</b>	3,7 c	4,2 d	3,4 b	1,9 a	I
25	Androsterilidad (presencia)	1,0b	0,0a	0,1a	0,0a	S
26	<b>Tipo ramificación (sin rami)</b>	1,0 c	1,0 c	0,3 b	0,0 a	I
27	Capítulo principal (presencia)	1,0 b	1,0 b	1,0 b	0,1 a	C
28	Superficie de hoja (encrespada)	1,0 b	0,5 a	0,8 ab	0,9 b	C,S
29	Margen de hoja (debilmente aserrada)	0,8 b	1,0 b	1,0 b	0,2 a	C
30	<b>Antocianina en tallo (presencia)</b>	0,0 a	0,0 a	0,4 b	0,7 b	S
31	<b>Antocianina en palea (presencia)</b>	0,0 a	0,0 a	0,7 b	0,9 b	S
32	<b>Antocianina en estigma (presencia)</b>	0,0 a	0,0 a	0,7 b	0,9 b	S
33	<b>Color del disco floral (rojo)</b>	0,0 a	0,0 a	0,7 b	0,9 b	S

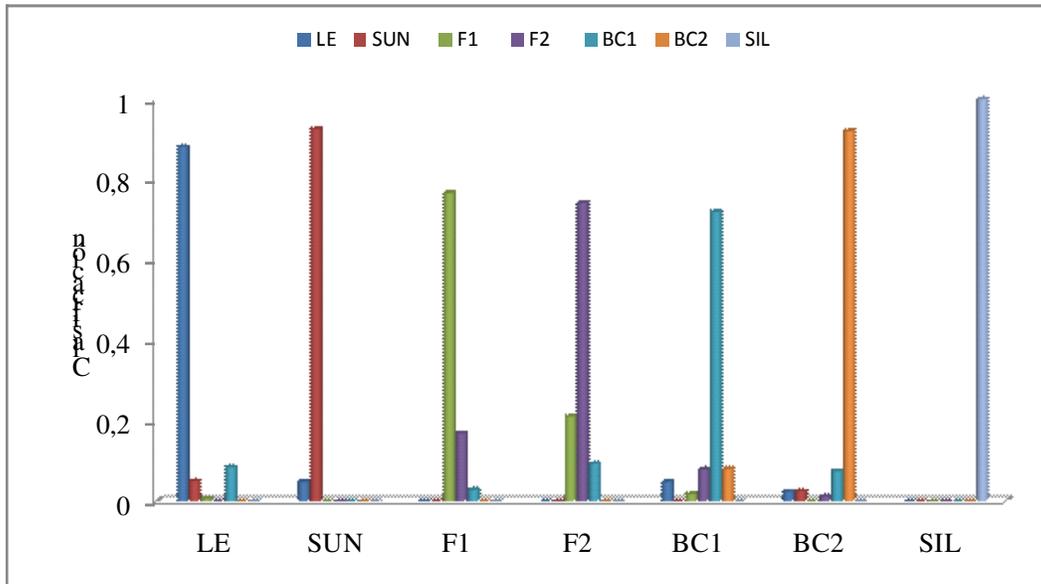
\*I: intermedio, C: cultivado, S: silvestre, T: transgresivo. Letras diferentes para cada caracter indican diferencias significativas para p<0.05.

Figura 5.1: Análisis de componentes principales de girasol silvestre (SIL) y cultivado (SUN), las líneas endocriadas (HA89, A10 y A09), F1, F2 y retrocruzas (R1 y R2) con plantas silvestres. En el inserto posterior se muestran los rasgos que están más correlacionados con los componentes 1 y 2.



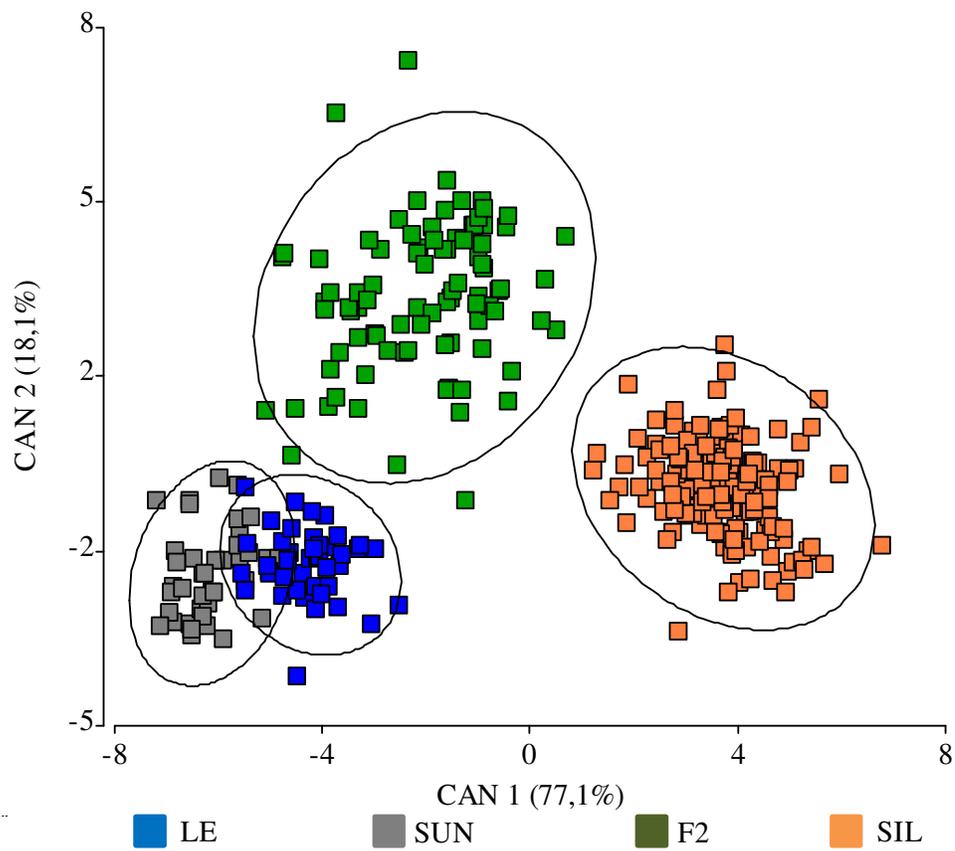
El análisis discriminante diferenció los grupos de SUN, F1, F2, BC1, BC2 y SIL. Sólo el 2,5 y el 5% de las plantas SUN fueron mal clasificadas como BC2 o LE, respectivamente. Aproximadamente el 23% de los individuos F1 fueron mal clasificados como F2 y BC1. Las generaciones de F2 y BC1 fueron las más variables, con 25 y el 28% de plantas mal clasificadas, respectivamente, pero nunca se incluyeron en la clasificación de SUN. El error de clasificación de las poblaciones de *H. annuus* fue cero, siendo todos los individuos clasificados como SIL (Figura 5.2).

Figura 5.2: Clasificación de plantas basada en el análisis discriminante de girasol cultivado (SUN), F1, F2 y retrocruzadas (BC1 y BC2) entre las líneas puras (LE) y girasol silvestre (SIL).



El análisis discriminante utilizando datos cuantitativos y cualitativos mostró que ninguno de los individuos de F2 se asemejaron a plantas silvestres de *H. annuus*, sino que fueron más parecidas a los materiales domesticados. Las líneas endocriadas constituyeron un subconjunto de los materiales cultivados (Figura 5.3).

Figura 5.3: Análisis discriminante de descendientes de plantas fuera de tipo (F2), silvestre (SIL), girasol cultivado (SUN) y líneas endocriadas (LE).



Elipses alrededor de los grupos indican el 95% de confianza.

## DISCUSIÓN

Los rasgos morfológicos fueron útiles para identificar las F1 entre las líneas endocriadas y *H. annuus* silvestre. La mayoría de los caracteres de F1 fueron intermedios entre ambos grupos. Schilling y Heiser (1981) utilizaron largo de pecíolo, color del disco floral, altura de planta, ancho hojas y brácteas para clasificar las especies de *Helianthus* anuales. Heiser (1978) distinguió *H. annuus* silvestre de la maleza por diámetro de capítulo menores de 5 cm, flores rojas del disco, ancho de brácteas de menos de 8 mm y ramificación total.

Las plantas F1 obtenidas en el presente estudio fueron claramente distintas de los materiales domesticados porque fueron más altas y produjeron varios capítulos. A su vez, ramificación, diámetro de capítulo, tamaño de bráctea y presencia de la pigmentación en el tallo, páleas y estigma, también caracterizaron a los híbridos cultivo-silvestre y representan rasgos de alto valor taxonómico porque no se ven afectados por el ambiente (Presotto *et al.*, 2009b). Una combinación de estos rasgos podría utilizarse para desarrollar una clave precisa para identificar a descendientes de cruzamientos cultivo-silvestre.

El análisis discriminante basado en rasgos cuantitativos revela que las plantas F2 podrían ser mal clasificadas como F1 (21%) o BC1 (9%), pero nunca clasificadas como líneas endocriadas o girasol domesticado. A su vez, las F2 y BC1 de cruzamientos cultivo-silvestre podrían ser plantas fuera de tipo en lotes de girasol, aunque ninguno de ellos se incluyeron entre plantas de *H. annuus* silvestre. Esto significa que estas generaciones fueron morfológicamente diferentes de sus progenitores silvestres.

La cosecha y procesamiento de semillas son vías de contaminación (Friesen *et al.*, 2003; Kawata *et al.*, 2009), pero el riesgo aumenta cuando *H. annuus* silvestre y girasol domesticado coexisten en la misma área. En virtud de los niveles internacionalmente aceptados de contaminaciones (OCDE, 2007), puede esperarse hasta un 5% de individuos fuera de tipo en un lote de girasol. Tomando este límite de tolerancia, la posibilidad de una segunda generación de plantas cultivo-silvestre parece ser muy bajo. Entre los híbridos cultivo-silvestre, el 9,3% de los individuos fueron androestériles, los que serían polinizados principalmente por plantas de cultivo, con más de 1400 flores

tubulares por capítulo (Aguirrezábal *et al.*, 1996). Por otra parte, la probabilidad de que las plantas F1 se autofecunden sería baja y la frecuencia prevista en la generación de F2 disminuirá a menos de 0,25%. La ausencia de desgrane y el gran tamaño de los frutos de las cruces cultivo-silvestre podrían disminuir su dispersión debido a su eliminación durante la cosecha y operaciones de manipulación de semillas.

En un lote de girasol infestado con descendientes de híbridos cultivo-silvestre, si las semillas caen al suelo, las plantas BC1 serían el genotipo más probable al año siguiente. Tanto las plantas F2 como estas retrocruzas y su segunda generación (BC2) no recuperan la morfología silvestre. Esto es una fuerte evidencia de que estos contaminantes no evolucionarían hacia girasoles maleza a través de la autofecundación o el cruzamiento con el cultivo de girasol. Estos resultados sugieren que el girasol maleza no podría haberse originado de híbridos cultivo-silvestre introducidos involuntariamente durante la producción de semillas y/o el procesamiento.

Los resultados demuestran la posibilidad de identificar híbridos cultivo-silvestre en la primera y sucesivas generaciones, BC1 o F2. El riesgo de originar una población de *H. annuus* silvestre por la contaminación de semillas con híbridos cultivo-silvestre es bajo. Esos contaminantes podrían ser controlados con buenas prácticas de manejo como el mantenimiento de maquinarias y caminos limpios para evitar el establecimiento de plantas silvestres de *H. annuus* junto a campos de producción de semillas y la propagación a nuevas zonas donde los girasoles silvestres no están presentes.

Es extremadamente importante la detección temprana y la eliminación de los individuos cultivo-silvestre en el cultivo de girasol. A pesar de que las plantas fuera de tipo no parecen ser nocivas para el agro-ecosistema, su aparición podría aumentar el riesgo de flujo génico si las poblaciones silvestres coexisten con el girasol. El largo período de floración de los híbridos cultivo-silvestre posibilita su función como puente biológico entre el girasol cultivado y silvestre, incluso en ausencia del cultivo (Reagon y Snow, 2006). Este escenario facilitaría la transferencia de rasgos que aumenten la invasividad de la especie, tales como la tecnología IMI recientemente lanzada en varias áreas de la producción de girasol. Este estudio proporciona información para identificar morfológicamente contaminantes cultivo-silvestre en condiciones agroecológicas normales de la producción de girasol.

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas que han sido útiles en la selección directa o indirecta de caracteres de interés (QTLs) en programas de mejora (Gupta, 2002) así como en el estudio de la evolución de los cultivos (Burger *et al.*, 2008). Es por eso que podrían ser utilizados para reforzar estos resultados morfológicos y fenológicos. Estudios previos de poblaciones segregantes entre girasol silvestre y girasol domesticado, han hallado QTLs vinculados a una temprana domesticación del girasol cultivado (Burke *et al.* 2002, 2005). La asociación entre caracteres como días a floración, diámetro de capítulo, autocompatibilidad, dormición de semilla y los marcadores moleculares que determinan esos caracteres podría aportar información sobre el origen genético de las poblaciones naturalizadas e invasoras de *H. annuus* en Argentina (Wills y Burke, 2007; Chapman *et al.*, 2008). Con el mismo objetivo, en un trabajo reciente se utilizaron marcadores de herencia materna ligados a la androesterilidad citoplasmática (PET1), proveniente de *H. petiolaris*. Esta fuente de androesterilidad está presente en todos los cultivares modernos de girasol y ausente en las poblaciones silvestres de *H. annuus*. Esa herramienta permitió comprobar que las poblaciones invasoras encontradas en regiones de Francia y España fueron originadas a partir de germoplasma domesticado (Müller *et al.*, 2011).

## CONSIDERACIONES FINALES

- Las semillas de las poblaciones silvestres de *H. annuus* presentaron elevados niveles de dormición de la semilla que se redujo con el almacenamiento a 5°C. La escarificación mecánica fue el sistema de acondicionamiento que mayor respuesta tuvo sobre la ruptura de la dormición indicando que posiblemente habría inhibidores presentes en el pericarpio o una permeabilidad diferencial que permite el ingreso de agua pero retardaría la salida de inhibidores.
- El cruzamiento con un híbrido comercial CL aumentó ligeramente la germinación de la semilla del girasol silvestre, por lo que la ruptura que este carácter no modificaría la aptitud de la progenie silvestre-cultivado y permitiría que la tolerancia a imidazolinonas permanezca en las poblaciones silvestres.
- Los individuos de poblaciones de *H. annuus* silvestre fueron susceptibles a las imidazolinonas aun en bajas dosis. El cruzamiento con el híbrido IMI-tolerante aumentó 64 veces la tolerancia a imidazolinonas en las progenie silvestre-cultivada aunque la tolerancia fue menor que la manifestada por el híbrido de girasol CL. Esto comprobó que la máxima tolerancia se obtendría cuando los genes AHAS están en estado homocigota. Sin embargo, la tolerancia adquirida por las F1 es suficiente para hacer práctica y económicamente inviable el control con imazapir.
- Las poblaciones silvestres de girasol fueron controladas con todas las sulfonilureas e imidazolinonas utilizadas en el presente trabajo. El cruzamiento con el híbrido imi-tolerante aumentó la tolerancia a imazapir e imazetapir. El híbrido de girasol CL fue tolerante a estas dos imidazolinonas y levemente tolerante a clorimuron. Por lo tanto, tanto los descendientes de híbridos cultivados CL y las F1 con este híbrido podrían convertirse en malezas en girasol CL o en otros cultivos CL como el maíz.

- Los primers p18/19 ligados al gen AHAS1 permitieron demostrar polimorfismo en los materiales cultivados, poblaciones silvestres y en la progenie silvestre-cultivada. Se comprobó que el alelo de la tolerancia se encuentra en muy baja frecuencia en las poblaciones silvestres de *H. annuus*. Las F1 presentaron genotipo heterocigota tolerante mientras que el híbrido IMI-tolerante y las F1 retrocruzadas con el girasol CL, genotipo homocigota tolerante. Por otro lado, la elevada frecuencia del alelo de la tolerancia en las poblaciones de Adolfo Alsina y Colonia Barón y la aparición de un nuevo alelo (A327) permitió inferir introgresión con *H. petiolaris*.
- Se identificó un biotipo invasor de *H. annuus* introgresado con girasol cultivado que en una densidad mayor a 3 plantas m<sup>-2</sup> redujo el rendimiento de girasol en un 49% y afectó la cantidad y calidad de la materia grasa por mezcla física con los granos de la maleza. A su vez, una proporción de la semilla que no fue cosechada se incorporó al banco del suelo. Bajo el peor escenario, aunque se evitara la fructificación de las plantas, la maleza podría persistir por 10 años en el suelo.
- Las plantas fuera de tipo cultivado-silvestre, originadas por contaminación de polen en lotes de producción de semilla, fueron fácilmente identificadas por caracteres morfológicos. Dado que las generaciones sucesivas, F2, R1 y R2 no recuperaron el fenotipo silvestre, se infiere que sería poco probable que puedan originar poblaciones ferales de girasol.

## REFERENCIAS

- Aguirrezábal L.A., Orioli G.A., Hernández L.F., Pereyra V.R., Miravé J.P. 1996. Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Unidad Integrada Balcarce. Buenos Aires. Argentina. 127 p.
- Alexander H.M., Schrag A. 2003. Role of soil seed banks and newly dispersed seed in population dynamics of the annual sunflower, *Helianthus annuus*. J. Ecol. 91: 987-998.
- Al-Khatib K., Baumgartner J.R., Peterson D.E., Currie R.S. 1998. Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). Weed Sci. 46: 403-407.
- Al-Khatib K., Petterson D.E., Regehr D.L. 2000. Control of imazetahpyr-resistant common sunflower (*Helianthus annuus*) in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). Weed Technol 14: 133-139.
- Allen J. R., Johnson W. G., Smeda R. J., Kremer R. J. 2000. ALS-resistant *Helianthus annuus* interference in *Glycine max*. Weed Sci. 48:461–466.
- Anfinrud M.N., 1997. Planting Hybrid Seed Production and Seed Quality Evaluation, chapter 14, en: Schneiter A.A. (ed.), Sunflower Technology and Production. Madison, WI, USA, p 697-708.
- Arias D.M., Rieseberg L.H. 1995. Genetic relationships among domesticated and wild sunflower. Econ. Bot. 43:239-248.
- Arregui C.M., Puricelli E. 2008. Mecanismos y modo de acción de los herbicidas, capítulo 3, en: Mecanismos de acción de plaguicidas. Arregui C.M.; Puricelli E. (eds.). Rosario, Argentina, p 125-203.
- Arriola P.E., Ellstrand N.C. 1996. Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. Am. J. Bot. 83:1153-1160.

Báez J.R., Mácola T. 1954. 509- Obtención de nuevas variedades e híbridos comerciales de girasol. IDIA 73-75: 77.

Bagavathiannan M.V., Van Acker R.C. 2008. Crop fertility: implications for novel trait confinement. *Agric., Ecosyst. Environ.* 127: 1-6.

Baker H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5:1-24.

BASF. 2008. La tecnología Clearfield® en girasol. Informe interno del Departamento Técnico BASF. Información cedida por Nidera S.A. ( atn. Dr. Carlos Sala).

BASF. 2010. En: <http://www.agro.basf.com.ar/clearfield/clearfield.htm>

Bàrberi P. 2004. Métodos preventivos y culturales para el manejo de malezas, en: Manejo de malezas para países en desarrollo Addendum I. Ladrada R. (ed.), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. En: <http://www.fao.org/docrep/007/y5031s/y5031s00.htm#Contents>

Baskin C.C., Baskin J.M. 1998. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Baskin J.M., Baskin C.C. 2004. A clasification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1–16.

Baumgartner J.R., Al-Khatib K., Currie R.S. 1999. Cross-resistance of imazethapyr-resistant common sunflower (*Helianthus annuus*) to selected imidazolinone, sulfonyleurea, and triazolopyrimidine herbicides. *Weed Technol* 13: 489-493.

BCBB. 2010. Bolsa de Cereales de Buenos Aires. En: [http://www.bolcereales.com.ar/pas\\_que\\_es.asp](http://www.bolcereales.com.ar/pas_que_es.asp)

Benech-Arnold R.L., Sanchez R.A., Forcella F., Kruk B.C., Gherza C.M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research* 67: 105-122.

Bernasconi P., Woodworth A.R., Rosen B.A., Subramanian M.V., Siehl D.L. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17381-17385.

Bertero de Romano A., Vasquez A.N. 2003. Origin of the Argentine sunflower varieties. *Helia* 26: 127-136.

Bervillé A. 2010. Oil composition variations, chapter 8, en: Hu, J; Seiler G.; Kole C. (eds), *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. Enfield, New Hampshire, USA, p 253-277.

Bervillé A., Müller, M.H., Poinso, B., Serieys, H., 2005. Ferality: Risks of gene flow between sunflower and other *Helianthus* species, en: Gressel J. (ed.), *Crop ferality and volunteerism: A threat to food security in the transgenic era?* CRC Press, Boca Raton, USA, p 209-230.

Booth B.D., Murphy S.D., Swanton C.J. 2003. *Weed ecology in natural and agricultural systems*. CABI publishing, London, UK. 303 p.

Breccia G., Vega T., Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R., Picardi L. 2010. Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed.* Online first 23 feb 2010.

Bruniard J.M., Miller J.F. 2001. Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24: 11-16.

Buhler D., Parochetti J., 2010. Characterize Weed Population Dynamics for Improved Long-Term Weed Management Decision Making (NC202). En: <http://nimss.umd.edu/homepages/outline.cfm?trackID=6699>

Burger J.C., Chapman M.A., Burke J.M. 2008. Molecular insights into the evolution of crop plants. *Am. J. Bot.* 95: 113-122.

Burke J.M., Knapps S.J., Rieseberg L.H. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics* 171: 1933-1940.

Burke J.M., Lai Z., Salmaso M., Nakazato T., Tang S., Heesacker A., Knapp S.J., Rieseberg L. H. 2004. Comparative mapping and rapid karyotypic evolution in the genus *Helianthus*. *Genetics* 167: 449-457.

Burke J.M., Gardner K.A., Rieseberg L.H. 2002. The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *Am. J. Bot.* 89:1550–1552.

Burke J.M., Tang S., Knapp S.J., Rieseberg L.H. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161:1257-1267.

Cantamutto M., Presotto A., Poverene M., Rivas J., Matarazzo R., Renzi J. 2007. *Helianthus* que amenazan la producción de semilla de girasol en el Valle Bonaerense del Río Colorado. Boletín Técnico 16. EEA INTA, Hilario Ascasubi, Argentina.

Cantamutto M., Alvarez D., Presotto A., Fernandez-Moroni I., Seiler G., Poverene M. 2008b. Seed morphology and oil composition of wild *Helianthus annuus* from Argentina. Proc. 17th Sunflower Conference. Int Sunflower Assoc. Córdoba, España, p 703-708.

Cantamutto M., Poverene M., Peinemann N., 2008a. Multi-scale analysis of two annual *Helianthus* species naturalization in Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123:69-74.

Cantamutto M., Presotto A., Fernandez-Moroni I., Alvarez D., Poverene M. Seiler G. 2010b. High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) naturally developed in central Argentina. *Flora* 205: 306-312.

Cantamutto M., Presotto A., Renzi J., Poverene M. 2008c. Preventing botanical contamination risk of sunflower hybrid seed in the Valle Bonaerense del Río Colorado, Argentina, in: Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Sunflower Conference. Córdoba, Spain. International Sunflower Association, p 697-702.

Cantamutto M., Torres L., Presotto A., Gutierrez A., Ureta S., Poverene M., 2010a. Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual *Helianthus* populations in central Argentina. *Biol. Invasions* 12: 541-551.

Chapman M.A., Pashley C.H., Wenzler J., Hvala J., Tang S., Knapp S.J., Burke J.M. 2008. A genomic scan for selection reveals candidates for genes involved in the evolution of cultivated sunflower (*Helianthus annuus*). *The Plant Cell* 20: 2931-2945.

CASAFE. 2007. Generalidades, herbicidas, fertilizantes, tomo I, en: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina (13° edición). Cámara de seguridad alimentaria y fertilizantes. 1064 p.

CIMMYT. 2006. Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo. Protocolos de laboratorio. Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. 80 p. En:

<http://apps.cimmyt.org/spanish/docs/manual/protocols/Lab-geneticaMolecular.pdf>

Clay S., Johnson G. 2002. Scouting for weeds. Online. Crop Management Doi:10.1094/CM-2002.1208-01-MA. En :

<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/management/weeds/>

Corbineau F., Baginol S., Come D. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Isr. J. Bot.* 39: 313-325.

Corbineau F., Rudnicki R.M., Comes D. 1989. ACC conversion to ethylene by sunflower seeds in relation to maturation, germination and thermodormancy. *Plant Growth regul.* 8: 105-115.

Cousens R.D., Young K.R., Tadayyon A. 2009. The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Ann. Bot.* 105: 101-108.

- Chandler J.M., Jan C.C. 1985. Comparison of germination techniques for wild *Helianthus* seeds. *Crop Sci.* 25: 356-358.
- Chauhan B.S., Gill G., Preston C. 2006. Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence of Oriental mustard (*Sisymbrium orientale*). *Weed Sci.* 54: 1025-1031.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. 2000. Influence of the Testa on Seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122:403-413.
- Deines J., Dilleb A., Blinkac E., Regehr D., Staggenborg S. 2004. Common sunflower (*Helianthus annuus*) and shattercane (*Sorghum bicolor*) interference in corn. *Weed Sci.* 52:976-983.
- Desrochers A., Rieseberg L. H. 1998. Mentor effects in wild species of *Helianthus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 85:770-775.
- Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. 1991 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.
- Duggleby R.G., Pang S.S., Yu H, Guddat L.W. 2003. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. *Eur. J. Biochem.* 270: 2895-2904.
- Duggleby R.G., Pang S.S. 2000. Acetohydroxyacid Synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33: 1-36.
- Dweikat I., 2005. A diploid, interspecific, fertile hybrid from cultivated sorghum, *Sorghum bicolor*, and the common Johnsongrass weed *Sorghum halepense*. *Mol. Breed.* 16:93-101.
- Ellstrand N.C., Prentice H.C., Hancock J.F. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants to their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 539-563.

Ellstrand N.C., 2003. Dangerous liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives, Johns Hopkins University Press (ed.). Baltimore MD. 244 p.

Faure N., Serieys H., Berville A., 2002. Potential gene flow from cultivated sunflower to volunteer, wild *Helianthus* species in Europe. *Agric. Ecosys. Envir.* 89: 183-190.

Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.

Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.

Flint J.L., Witt W.W. 1997. Microbial degradation of Imazaquin and imazethapyr. *Weed Sci.* 45: 586-591.

Friesen L.F., Nelson A.G., Van Acker R.C. 2003. Evidence of contamination of pedigreed canola (*Brassica napus*) seed lots in western Canada with genetically engineered herbicide resistance traits. *Agron. J.* 95: 1342-1347.

Gay C., Corbineau F., Côme D. 1991. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 31: 193-200.

Geier P.W., Maddux L.D., Moshier L.J., Stahlman P.W. 1996. Common sunflower (*Helianthus annuus*) interference in soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.* 10:317-321.

Gillespie G., Miller S.D. 1984. Sunflower competition in wheat. *Can. J. Plant Sci.* 64: 105-111.

Groot M.H.M., van de Wiel C.C.M., van Tienderen P.H., den Nijs H.C.M. 2003. Hybridisation and introgression between crops and wild relatives. Current knowledge and research priorities in lieu of impending introductions of GM crops. University of Amsterdam and Plant Research International. Amsterdam and Wageningen. 55 p.

Gupta P.K. 2002. Molecular markers and QTL analysis in crop plants. *Curr. Sci.* 83: 113-114.

Gunsolus J.L. 2002. Herbicide resistant weeds. University of Minnesota. En: <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc6077.html>

Gutierrez A., Carrera A., Basualdo J., Rodriguez R., Cantamutto M., Poverene M. 2010. Gene flow between cultivated sunflower and *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Euphytica* 172: 67-76.

Håkansson S. 2003. Weeds and weed management on arable land: an ecological approach. CABI publishing. London, UK. 274 p.

Hall L.M., Devine M.D. 1990. Cross-resistance of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Stellaria media* to a triazolopyrimidine herbicide. *Plant Physiol.* 93: 962-966.

Harlan J.R., 1992. Crops and man. Second Edition. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America (ed.). Madison, USA. 284 p.

Harter A.V., Gardner K.A., Falush D., Lentz D.L., Bye R.A., Rieseberg L.H. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* 430: 201-205.

Heap I. 2010. Weed Science. International survey of herbicide resistant weeds. En: <http://www.weedscience.org/In.asp>

Heiser C.B., 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. chapter 2, en: Carter J (ed.), *Sunflower Science and Technology*. Madison, USA, p 31-53.

Hernández L.F., Paoloni P.J. 1998. Germinación y emergencia de cuatro híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) con diferente contenido lipídico y en relación con la temperatura. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 13: 345-358.

Hockett E. A., Knowles P.F., 1970. Inheritance of branching in sunflowers, *Helianthus annuus* L. Crop Sci. 10: 432-436.

Hu X.W., Wang Y.R., Wu Y.P. 2009. Effects of the pericarp on imbibitions, seed germination, and seedling establishment in seeds of *Hedysarum scoparium* Fisch. et Mey. Ecol. Res. 24: 559-564.

INASE (Instituto Nacional de Semillas). 2007. Certificación Nacional. <http://www.inase.gov.ar>

INFOSTAT 2008. *InfoStat version 1.1./Professional*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Ingaramo J., Feoli C. 2008. La importancia del complejo girasol en Argentina, capítulo 1, en: Quiroga A; Pérez Fernández J (eds.), El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. EEA INTA Anguil, p 1-11.

ISTA- International Seed Testing Association, 2004. International rules for seed testing. Glattbrugg, Switzerland. 410 p.

Istilart C. 2002. Residualidad de imidazolinonas sobre cereales de invierno. En: [http://www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agricultura/carpeta\\_cos\\_fina/residualidad84.pdf](http://www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agricultura/carpeta_cos_fina/residualidad84.pdf)

Jan C.C., Seiler G.J. 2007 Sunflower, en: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Volume 4: Oilseed Crops. Singh R. (ed.) CRC Press, Boca Raton, p 103-165.

Kawata M., Murakami K., Ishikawa T. 2009. Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. Environ. Sci. Pollut. Res. 16:120-126.

Knezevic S.Z., Streibig J.C., Ritz C. 2007. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. Weed Technol 21: 840-848.

Kolkman J.M., Slabaugh M.B., Bruniard J.M., Berry S., Bushman B.S., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J.F., Leon A., Knapp S.J. 2004. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109:1147–1159.

Labrada-Romero R. 2009. The lurking menace of weeds, Farmers' enemy No. 1. En: <http://www.fao.org/news/story/0/item/29402/icode/en/>

Lai Z., Kane N.C., Zou Y., Rieseberg L.H. 2008. Natural variation in gene expression between wild and weedy populations of *Helianthus annuus*. *Genetics* 179: 1881-1890.

Landbo L., Jørgensen R.B. 1997. Seed germination in weedy *Brassica campestris* and its hybrids with *B. napus*: implications for risk assessment of transgenic oilseed rape. *Euphytica* 97: 209.216.

Le Page-Degivry M.T., Garelo G. 1992. *In situ* abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol.* 98: 1386-1390.

Mallory-Smith C.A, Retzinger JR E.J. 2003. Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies1. *Weed Technol.* 17: 605-619.

Marshall M.W., Al-Khatib K., Loughin T. 2001. Gene flow, growth, and competitiveness of imazethapyr-resistant common sunflower. *Weed Sci.* 49:14-21.

Martínez-Ghersa M.A., Ghersa C.M. 2006. The relationship of propagule pressure to invasion potential in plants. *Euphytica* 148: 87-96.

Massinga R.A., Al-khatib K., St Amand P., Miller J.F. 2003. Gene flow from imidazolinone-resistant domesticated sunflower to wild relatives. *Weed Sci.* 51: 854-862.

Mercer K.L., Shaw R.G., Wyse D.L. 2006a. Increased germination of diverse crop-hybrid sunflower seeds. *Ecological Applications* 16:845-854.

Mercer K.L., Wyse D.L., Shaw R.G. 2006b. Effects of competition on the fitness of wild and crop-wild hybrid sunflower from a diversity of wild populations and crop lines. *Evolution* 60: 2044-2055.

Merotto A., Jasieniuk M., Osuna M.D., Vidotto F., Ferrero A., Fischer A.J. 2009. Cross-resistance to herbicides of five ALS-inhibiting groups and sequencing of the ALS gene in *Cyperus difformis* L. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1389-1398.

Mesbah A., Miller S., Koetz P. 2004. Common Sunflower (*Helianthus annuus*) and Green Foxtail (*Setaria viridis*) Interference in Dry Bean. *Weed Technol.* 18:902-907.

Milberg P., Andersson L. 1998. Does cold stratification level out differences in seed germinability between populations? *Plant Ecology* 134: 225-234.

Milberg P., Andersson L., Thompson K. 2000. Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Sci. Res.* 10: 99-104.

Miller J.F., Al-Khatib K. 2002. Registration of imidazolinone herbicide-resistant sunflower maintainer (HA425) and fertility restorer (RHA426 and RHA427) germplasms. *Crop Sci.* 42: 988-989.

Miller J.F., Al-Khatib K. 2004. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2 resistant to tribenuron herbicide. *Crop Sci.* 44: 1037-1038.

Moody-Weis J., Alexander H.M. 2007. The mechanisms and consequences of seed bank formation in wild sunflowers (*Helianthus annuus*). *J. Ecol.* 95: 851-864.

Moyer J.R., Coen G., Dunn R., Smith A.M. 2010. Effects of Landscape Position, Rainfall, and Tillage on Residual Herbicides. *Weed Technol.* 24: 361-368.

Müller M.H., Arlie G., Bervillé A., David J., Delieux F., Fernandez-Martinez J.M., Jouffret P., Lecomte V., Reboud X., Rousselle Y., Serieys H., Teissere N., Tsitrone A. 2006. Le compartiment spontané du tournesol *Helianthus annuus* en Europe: prospections et premières caractérisations génétiques. Les Actes du BRG 6: 335-353.

Müller M.H., Délieux F., Fernández-Martínez J.M., Garric B., Lecomte V., Anglade G., Leflon M., Motard C., Segura R., 2009. Occurrence, distribution and distinctive morphological traits of weedy *Helianthus annuus* L. populations in Spain and France. Genet. Resour. Crop Evol. 56:869–877.

Müller M.H., Latreille M., Tollon C. 2011. The origin and evolution of a recent agricultural weed: population genetic diversity of weedy populations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Spain and France. Evolutionary Applications 4: 499-514.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2007. OECD scheme for the varietal certification of crucifer seed and other oil or fibre species seed moving in international trade. En: <http://www.oecd.org/dataoecd/41/4/15289142.PDF>.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004. Consensus document on the biology of *Helianthus annuus* L. (sunflower). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology N° 31. En: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2004\)30&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2004)30&doclanguage=en)

Olivieri A.M., Jain S.K. 1978. Effects of temperature and light variations on seed germination in sunflower (*Helianthus*) species. Weed Sci. 26: 277-280.

Pang S.S, Duggleby R.G, Guddat L.W. 2002. Crystal tructure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. J. Mol. Biol. 317: 249-262.

Paterson H.P., Schertz K.F., Lin Y., Chang Y. 1995. The weediness of wild plants: molecular analysis of genes influencing dispersal and persistence of johnsongrass (*Sorghum halepense* L). Proc. Natl. Acad. Sci. 92:6127-6131.

Patzoldt W.L., Tranel P.J., Alexander A.L., Schmitzer P.R. 2001. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. *Weed Sci.* 49: 485-490.

Piñeiro M., Villarreal F. 2005. Modernización agrícola y nuevos actores sociales. *Ciencia Hoy* 15:32-36.

Poverene M., Cantamutto M., Seiler G.J. 2008. Ecological characterization of wild *Helianthus annuus* and *Helianthus petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 7: 42-49.

Poverene M., Cantamutto M., Carrera A., Ureta M., Salaberry M., Echeverria M., Rodriguez R. 2002 El girasol silvestre (*Helianthus* spp.) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. *Rev. Invest. Agrop.* 31: 97-116.

Powles S.B., Preston C., Bryan I.B., Jutsum A.R. 1997. Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.* 58: 57-93.

Presotto A. 2007. Caracterización fenotípica de poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* naturalizadas en Argentina. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Sur. 78 p.

Presotto A., Cantamutto M., Poverene M., Seiler G. 2009a. Phenotypic diversity in wild *Helianthus annuus* from Argentina. *Helia* 32: 37-50.

Presotto A., Fernandez-Moroni I., Fraysse M., Poverene M., Cantamutto M. 2009b. Plasticidad fenotípica de *Helianthus annuus* L. naturalizado en Argentina, in: XXXVIII Congreso Argentino de Genética, San Miguel de Tucumán, Argentina. Fundación Miguel Lillo, p 135.

Putt E.D., Sackston W.E. 1957. Studies on rust. I. Some sources of rust resistance. *Can. J. Plant Sci.* 37: 43-54.

R2.9.0. 2009. The R project for statistical computing. Disponible en: <http://www.r-project.org/>

Reagon M., Snow A., 2006. Cultivated *Helianthus annuus* (Asteraceae) volunteers as a genetic ‘‘bridge’’ to weedy sunflower populations in North America. *Am. J. of Bot.* 93: 127–133.

Rieseberg L.H., Van Fossen C., Desrochers A. 1995. Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature.* 375: 313-316.

Ritz C., Streibig J.C. 2005. Bioassay analysis using R. *Journal of statistical software* 12: 1-22.

Rosales-Robles E., Salinas Garcia J.R., Sanchez de la Cruz R., Esqueda Esquivel V., 2002. Interference and control of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in northeastern México. *Cereal Res. Commun.* 30: 439-446.

Rosales-Robles E., Sanchez de la Cruz R., Salinas Garcia J.R., 2005. Critical period of competition of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) in grain sorghum. *Agrociencia (Méx.)*, 39:205-210.

Rosario J.M., Cruz-Hipolito H., Smeda R.J., DePrado R. 2011. White mustard (*Sinapis alba*) resistance to ALS-inhibiting herbicides and alternative herbicides for control in Spain. *Eur. J. Agron. En prensa.*

Rost T.L., Reynolds T. 1985. Reversal of chlorsulfuron-induced inhibition of mitotic entry by isoleucine and valine. *Plant Physiol.* 77: 481-482.

Sala C.A., Bulos M., Echarte A.M. 2008b. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Crop Sci.* 48: 1817-1822.

Sala C.A., Bulos M., Echarte M., Whitt S., Ascenzi R. 2008a. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 118: 105–112.

SAS 2002. SAS Institute Inc 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2002-2005.

Sathasivan K., Haughn G.W., Murai N. 1991. Molecular Basis of Imidazolinone Herbicide Resistance in *Arabidopsis thaliana* var Columbia. *Plant Physiol.* 97: 1044-1050.

Schilling E.C., Heiser C.B. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (*Compositae*). *Taxon* 30:393-403.

Schneiter A.A., Miller J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21: 901-903.

Schweizer E.E., Bridge L.D. 1982. Sunflower (*Helianthus annuus*) and velveleaf (*Abutilon theophrasti*) interference in sugarbeets (*Beta vulgaris*). *Weed Sci.* 30: 514-519.

Seiler G., Rieseberg L.H. 1997. Systematics, Origin, and Germplasm Resources of the Wild and Domesticated Sunflower, chapter 2, en: Schneiter A. (ed.), *Sunflower Technology and Production*, American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA, p 21-65.

Seiler G.J. 1998. Seed maturity, storage time and temperatura, and media treatment effects on germination of two wild sunflowers. *Agron. J.* 90: 221-226.

Seiler G. J., 1983. Effect of genotype, flowering date, and environment on oil content and oil quality of wild sunflower seed. *Crop Sci.* 23: 1063-1068.

Seiler G.J. 2009. Are wild sunflower achenes stored at room temperature for 20 years still alive?. *Proceedings 31st Sunflower Research Workshop, National Sunflower*

Association, January 13-14, 2009, Fargo, ND. En:  
<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/34844/1/IND44266110.pdf>

Smith D.L., 1978. Planting Seed Production, chapter 11, en: Carter, J (ed.), Sunflower Science and Technology. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, p 371-386.

Snow A.A., Moran-Palma P., Rieseberg L.H., Wszelaki A., Seiler G.J. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). Am. J. Bot. 85:794-801.

Sprague C.L., Stoller E.W., Wax L.M. 1997. Common cocklebur (*Xanthim strumarium*) resistance to selected ALS-inhibiting herbicides. Weed Technol. 11: 241-247.

Stanković-kalezić R., Kojić M., Vrbničanin S., Radivojević L.J., 2007. *Helianthus annuus*-A new important element of the non-arable and arable flora in Serbia's region of Southern Banat. Helia 30:37-42.

Tan S., Evans R.R., Dahmer M. L., Singh B. K., Shaner D. L. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Manag. Sci. 61: 246-257.

Toyomasu T., Kawaide H., Mitsunashi W., Inoue Y., Kamiya Y. 1998. Phytochrome regulates gibberellins biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. Plant Physiol. 118: 1517-1523.

Tranel P.J., Wright T.R. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? Weed Sci. 50: 700-712.

Ulbrich A.V., Souza J.R.P., Shaner D. 2005. Persistence and carryover effect of imazapic and imazapyr in brazilian cropping systems. Weed Technol. 19: 986-991.

Ureta S., Cantamutto M., Carrera A., Delucchi C., Poverene M., 2008. Natural hybrids between cultivated and wild sunflowers in Argentina. Genet. Resour. Crop Evol. 55: 1267-1277.

USDA- U.S. Department of Agriculture., 2010. Foreign Agricultural Service.  
<http://www.fas.usda.gov/>

USDA- United States Department of Agriculture. 2010. ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. En: [www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/crop.pl?79](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/crop.pl?79)

Van Auken O.W. 2001. Germination requirement of seeds of *Helianthus paradoxus* (Asteraceae). *Texas J Sci* 53: 157-170.

Vidal R.A., Rainero H.P., Kalsing A., Trezzi M.M. 2010. Prospección de las combinaciones de herbicidas para prevenir malezas tolerantes y resistentes al glifosato. *Planta daninha* 28: 159-165.

Vischi M., Cagiotti M.E., Cenci C.A., Seiler G.J., Olivieri A.M. 2006. Dispersal of wild sunflower by seed and persistent basal stalks in some areas of central Italy. *Helia* 29: 89-94.

Warwick S.I., Sauder C.A., Beckie H.J. 2010. Acetolactate synthase (ALS) target-site mutations in ALS inhibitor-resistant Russian thistle (*Salsola tragus*). *Weed Sci.* 58: 244-251.

Whaley C.M., Wilson H.P., Westwood J.H. 2007. A New Mutation in Plant ALS Confers Resistance to Five Classes of ALS-Inhibiting Herbicides. *Weed Sci.* 55:83-90.

White A.D., Grahan M.A., Owen M.D. 2003. Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. *Weed Sci.* 51: 845-853.

White A.D., Owen M.D.K., Hartzler R.G., Cardina J. 2002. Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 50: 432-437.

Wills D.M., Burke J.M. 2007. Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics* 176: 2589-2599.

Yamauchi Y., Ogawa M., Kuwahara A., Hanada A., Kamiya Y., Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Cell* 16: 367-378.

Zelaya I.A., Owen M.D.K. 2004. Evolved resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in common sunflower (*Helianthus annuus*), giant ragweed (*Ambrosia trifida*), and shattercane (*Sorghum bicolor*) in Iowa. *Weed Sci.* 52: 538-548.

Zollinger R. 2003. Innovaciones en control de malezas en girasol. En 2° Congreso Argentino de Girasol de la Asociación Argentina de Girasol, Buenos Aires, Argentina. En: <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/pdf/1-Malezas.pdf>

## **PRODUCCION CIENTIFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS**

### **PUBLICACIONES**

#### **Revistas con referato**

**Presotto A.**, Cantamutto M., Poverene M., Seiler G. Phenotypic diversity in wild *Helianthus annuus* from Argentina. 2009. *Helia* 32: 37-49.

Cantamutto, M., Torres L., **Presotto A.**, Gutierrez A., Ureta S., Poverene M. 2010. Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual. 2010. *Biological Invasions* 12: 541-551.

Cantamutto M., **Presotto A.**, Fernandez-Moroni I., Alvarez D., Poverene M., Seiler G. 2010. High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) naturally developed in central Argentina. *Flora* 205: 306-312.

Cantamutto M., Poverene M., **Presotto A.**, Alvarez D., Lenardon S., Rodríguez R., Martín Sánchez J., Fernández Moroni I., Giolitti F., Garayalde A., Haucke A., Bellido A., Fraysse M. 2010. The argentine wild *Helianthus annuus* L. genetic resource. *Helia* 33: 47-52.

**Presotto A.**, Fernandez-Moroni I., Poverene M., Cantamutto M. 2011. Sunflower Crop-Wild Hybrids: Identification and Risks. *Crop Protection* 30 (6): 611-616.

#### **Artículos de divulgación**

Cantamutto M., **Presotto A.**, Poverene M., Rivas J., Matarazzo R., Renzi J. *Helianthus* que amenazan la producción de semilla de girasol en el valle bonaerense del Río Colorado. 2007. Boletín técnico N° 16 (ISSNA 0328-3321), publicaciones regionales INTA EEA Hilario Ascasubi.

Cantamutto M., Poverene M., **Presotto A.**, Fernandez-Moroni I., Gutiérrez A., Ureta S., Casquero M. 2010. ¿Está domesticado el girasol? *Ciencia Hoy* 115: 20-29.

#### TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTIFICAS

- **35° Congreso Argentino de Genética.** (24-27/09/2006, San Luis). “Transferencia del carácter resistencia a imazapir desde girasol cultivado a las poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* ssp. *annuus*”. Ureta M, **Presotto A.**, Cantamutto M, Carrera A, Poverene M.
- **ASAGIR. 4° Congreso Argentino de Girasol.** (29 y 30/05/2007, Buenos Aires). “Aptitud del Valle Bonaerense del Río Colorado para malezas anuales del género *Helianthus*.” **Presotto A.**, Cantamutto M, Rivas J, Poverene M.
- **ASAGIR. 4° Congreso Argentino de Girasol.** (29 y 30/05/2007, Buenos Aires). “Valoración Agronómica de Poblaciones Argentinas de *Helianthus annuus* y *H. petiolaris*.” Cantamutto M, **Presotto A.**, Poverene M, Alvarez D, Rodríguez R, Lenardón S, Giolitti F, Martín Sanchez J.
- **ASAGIR. 4° Congreso Argentino de Girasol.** (29 y 30/05/2007, Buenos Aires). “Interferencia del Girasol Silvestre sobre un Híbrido Clearfield de Girasol Cultivado” Errazu P, **Presotto A.**, Cantamutto M.
- **ASAGIR. 4° Congreso Argentino de Girasol.** (29 y 30/05/2007, Buenos Aires). “Aptitud de Plantas de Girasol Silvestre y de sus Híbridos con Girasol Cultivado Imi-Resistente” Ureta M, **Presotto A.**, Cantamutto M, Carrera A, Poverene M.
- **36° Congreso Argentino de Genética.** (23-27/09/2007, Pergamino). “Análisis molecular y morfológico de poblaciones argentinas de *Helianthus annuus*” Garayalde A, **Presotto A.**, Cantamutto M, Carrera A
- **36° Congreso Argentino de Genética.** (23-27/09/2007, Pergamino). “Zonas híbridas entre especies silvestres de *Helianthus* en Argentina” Cantamutto M, Ureta MS, Gutiérrez A, **Presotto A.**, Poverene, M.
- **36° Congreso Argentino de Genética.** (23-27/09/2007, Pergamino). “Hibridación espontánea entre girasol cultivado y su pariente silvestre *Helianthus petiolaris* en la región pampeana” Gutiérrez A, **Presotto A.**, Cantamutto M, Poverene M.

- **Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe** (12-16/11/2007, México). “Modificación del germoplasma silvestre de girasol en Argentina por flujo genético desde el cultivo” Ureta S, **Presotto A**, Gutiérrez A, Carrera A, Cantamutto M, Poverene M.
- **17th International Sunflower Conference** (8-12/06/2008, España) “Preventing botanical contamination risk of sunflower hybrid seed in the Valle Bonaerense del Río Colorado, Argentina” Cantamutto M, **Presotto A**, Renzi JP, Poverene M.
- **17th International Sunflower Conference** (8-12/06/2008, España) “Seed morphology and oil composition of wild *Helianthus annuus* from Argentina” Cantamutto M, Alvarez D, **Presotto A**, Fernandez-Moroni I, Seiler G, Poverene M.
- **37° Congreso Argentino de Genética.** (21-24/09/2008, Tandil). “Estudio morfológico de frutos de girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.) de Argentina” Fernandez Moroni I, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M
- **37° Congreso Argentino de Genética.** (21-24/09/2008, Tandil). “Caracterización molecular de plantas tolerantes a imidazolinonas en cruces entre girasol silvestre (*Helianthus annuus*) y cultivado” **Presotto A**, Ureta S, Carrera A, Cantamutto M, Poverene M.
- **37° Congreso Argentino de Genética.** (21-24/09/2008, Tandil). “Avances en la caracterización de plantas androestériles de girasol silvestre de argentina” Garayalde A, **Presotto A**, Alvarez D, Rodriguez R, Cantamutto M.
- **38° Congreso Argentino de Genética.** (20-23/09/2009, San Miguel de Tucumán). “Plasticidad fenotípica de *Helianthus annuus* L. naturalizado en Argentina” **Presotto A**, Fernandez Moroni I, Fraysse M, Poverene M, Cantamutto M.
- **38° Congreso Argentino de Genética.** (20-23/09/2009, San Miguel de Tucumán). “Selección por tolerancia temprana a baja temperatura utilizando *Helianthus annuus* L. naturalizado de Argentina” Fernandez Moroni I, Laxague F, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M.
- **38° Congreso Argentino de Genética.** (20-23/09/2009, San Miguel de Tucumán). “Busqueda de tolerancia a estrés hídrico en floración en *Helianthus annuus* L. naturalizado de Argentina” Fernandez Moroni I, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M.

- **38° Congreso Argentino de Genética.** (20-23/09/2009, San Miguel de Tucumán). “Clasificación de híbridos naturales entre especies anuales del género *Helianthus*” Mondón A, Gutierrez A, **Presotto A**, Ureta S, Cantamutto M, Poverene M.
- **XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** (30/9 al 2/10/2009, Termas de Río Hondo).
- “Caracterización de la interferencia de malezas del género *Helianthus* en un lote de girasol” **Presotto A**, Casquero M, Errazu P, Cantamutto M.
- **XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** (30/9 al 2/10/2009, Termas de Río Hondo).
- “Relevamiento de malezas del género *Helianthus* en lotes de girasol en el área de naturalización de las especies anuales” **Presotto A**, Casquero M, Cantamutto M.
- **XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** (30/9 al 2/10/2009, Termas de Río Hondo).
- “Tolerancia a imidazolinonas e interferencia sobre un cultivo de maíz CL® de la cruza girasol IMI-silvestre argentino” Casquero M, **Presotto A**, Cantamutto M.
- **XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** (30/9 al 2/10/2009, Termas de Río Hondo).
- “Interferencia de plantas aisladas de cuatro genotipos de *Helianthus annuus* sobre girasol CL®” Casquero M, **Presotto A**, Colombo A; Bongiovanni M, Cantamutto M.
- **Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe** (28-30/10/2009, Chile). “Transferencia del carácter resistencia a imazapir (IMI) y modificación de la aptitud biológica de girasol silvestre” Ureta S, **Presotto A**, Cantamutto M, Poverene M.
- **8th European Sunflower Biotechnology Conference.** (1-3/03/2010, Turquía). “The argentine wild *Helianthus annuus* L. genetic resource” Cantamutto M, Poverene M, **Presotto A**, Alvarez D, Lenardon S, Rodríguez R, Martín Sánchez J, Fernández Moroni I, Giolitti F, Garayalde A, Haucke A, Bellido A, Fraysse M.
- **Taller ASAGIR 2010** (30-31/03/2010, Mar del Plata). “Estudio de contaminantes por flujo de polen de *Helianthus annuus* silvestre durante la

producción de semilla híbrida de girasol” **Presotto A**, Casquero M, Fernandez Moroni I, Poverene M, Cantamutto M.

- **Taller ASAGIR 2010** (30-31/03/2010, Mar del Plata). “Busqueda de tolerancia a estrés biótico y abiótico en cruzamientos con *Helianthus annuus* naturalizado en Argentina” Fernández Moroni I, **Presotto A**, Alvarez D, Lenardón S, Laxague F, Giolitti F, Poverene M, Cantamutto M.
- **ASAGIR. 5º Congreso Argentino de Girasol.** (1 y 2/06/2010, Buenos Aires). “Rendimiento y calidad de un cultivo de girasol bajo la interferencia de *Helianthus annuus* L. maleza” **Presotto A**, Casquero M, Errazu P, Fritz N, Cantamutto M.
- **ASAGIR. 5º Congreso Argentino de Girasol.** (1 y 2/06/2010, Buenos Aires). “Efecto de la interferencia por plantas aisladas de cuatro genotipos de *Helianthus annuus* sobre la fenología y estructura de un girasol CL®” Casquero M, **Presotto A**, Colombo A, Bongiovanni M, Cantamutto M.
- **ASAGIR. 5º Congreso Argentino de Girasol.** (1 y 2/06/2010, Buenos Aires). “Cambios fenotípicos de un girasol imi causados por la interferencia de genotipos invasores de *Helianthus* anuales (GIHA) a alta densidad” Casquero M, Kiehr K, Luisoni A, **Presotto A**, Cantamutto M.
- **ASAGIR. 5º Congreso Argentino de Girasol.** (1 y 2/06/2010, Buenos Aires). “Acciones preventivas del ingreso de *Helianthus petiolaris* L. al Valle Bonaerense del Río Colorado” Cantamutto M, **Presotto A**, Casquero M, Renzi JP.
- **International Symposium Sunflower Breeding on Resistance to Diseases.** (23-24/06/2010, Rusia) “Argentine wild *Helianthus annuus* L. as a genetic resource for Sunflower Chlorotic Mottle Virus (SuCMoV) resistance” Cantamutto M, Lenardon S, **Presotto A**, Alvarez D, Fernandez Moroni I, Giolitti F, Poverene M.
- **XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal** (26-29/09/2010, La Plata) “Evaluación de parámetros para el análisis de tolerancia a frío en etapas iniciales de material genético heterogeneo de la especie *Helianthus annuus*” Fernandez-Moroni I, Laxague F, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M.
- **XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal** (26-29/09/2010, La Plata) “Relación entre parámetros fisiológicos destinados al estudio del estado hídrico

en poblaciones de *Helianthus annuus* ssp. *annuus* naturalizados en Argentina”  
Fernandez-Moroni I, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M.

- **XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal** (26-29/09/2010, La Plata)  
“Evaluación preliminar de poblaciones argentinas de *Helianthus annuus* ssp. *annuus* por tolerancia a estrés hídrico” Fernandez-Moroni I, **Presotto A**, Poverene M, Cantamutto M.
- **ALAG. Congreso Latinoamericano de Genética** (1-5/10/2010, Chile)  
“Tolerancia a imazapir en *Helianthus annuus* silvestre por cruzamiento con un girasol clearfield” **Presotto A**, Cantamutto M, Poverene M.