

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SUR

Departamento de Agronomía

**Flujo génico entre girasol cultivado y
silvestre en la Argentina**

Ing. Agr. MARÍA SOLEDAD URETA



**Tesis presentada para optar por el grado de
Doctor en Ciencias Agrarias**

Directora: Dra. M. Mónica Poverene

Bahía Blanca, abril de 2010

PREFACIO

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias 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 el Laboratorio de Genética, dependiente del Departamento de Agronomía, durante el periodo comprendido entre Abril de 2001 y la fecha actual, bajo la dirección de la Dra. Mónica Poverene, Profesora Titular de Genética.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Poverene, mucho más que una directora, por su apoyo, su comprensión, su paciencia y su afecto. Por alentarme permanentemente, corrigiéndome, enseñándome, trabajando siempre a mi lado.

A Alicia “Delia” Carrera, por su apoyo incondicional y desinteresado, al enseñarme a trabajar en el laboratorio, transmitiéndome toda su experiencia.

A Miguel “Bochi” Cantamutto por sus horas de campo, por los diseños, la logística y su experiencia, que me permitió llevar adelante todos los ensayos experimentales.

A Agustina y Alejandro por su apoyo, por acompañarme en las horas de escritura y cubrir mi espacio cuando la vida no me lo permitió.

A Andrea y Eliana por invitarme a participar de mi primer proyecto científico cuando era aún alumna de grado. Por darme mis primeras herramientas.

A Carla, Marina, Aurora y Paula, por su amistad, por hacer más amenas las horas de laboratorio.

A TODOS mis compañeros de laboratorio, han sido tantos que temo nombrarlos pero cada uno participó de algún modo en este proyecto que llega a su fin.

A Nelly y Alicia M. por su colaboración desinteresada y sus aportes para la edición de esta tesis.

A CIC (Comisión de Investigaciones Científicas) y CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), por las Becas de Postgrado que me permitieron llevar adelante esta tesis.

A mi marido, Luis, por ayudarme con el campo, por escuchar mis decepciones cuando no obtenía resultados satisfactorios en el laboratorio y por todo lo que me enseñó luego, en el silencio.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por invitarme siempre a superarme y a lograr mis objetivos en la vida. Por el gran ejemplo que han sido siempre para mí.

A mis hermanos Rodrigo, Luciano, Matías y Micaela, porque fueron, son y serán el lugar donde recargar energías para seguir con los proyectos de vida.

A mis amigos, por su afecto, por su sostén aún cuando no entendieran mucho de qué se trataba.

A Hugo querido, por su apoyo, por haberme cubierto en lo personal, para que pudiera concretar este proyecto.

A mi comunidad de la Iglesia, por mantener siempre mis proyectos en su oración y darme las fuerzas para seguir adelante.

A Dios, porque sin Él nada hubiese sido posible.

A mi familia.

INDICE

PREFACIO	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
Capítulo I	13
El girasol silvestre en Argentina	13
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	14
Discusión	19
Capítulo II	25
Variabilidad genética en poblaciones de <i>Helianthus annuus</i>	25
Materiales y Métodos.....	26
Resultados.....	31
Discusión	40
Capítulo III	44
Hibridación natural e introgresión entre girasol cultivado y silvestre	44
Materiales y Métodos.....	45
Resultados.....	50
Discusión	60
Capítulo IV	65
Flujo génico entre girasol cultivado y silvestre	65
Materiales y Métodos.....	66
Resultados.....	72
Discusión	76
Capítulo V	78
Evaluación del impacto ambiental mediante el carácter resistencia a Imazapir.....	78
Materiales y Métodos.....	79
Resultados.....	84
Discusión	91
CONSIDERACIONES FINALES	94

REFERENCIAS.....	95
PRODUCCION CIENTIFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Poblaciones de <i>H. a. annuus</i> analizadas mediante marcadores moleculares.....	27
Tabla 2.2. Soluciones de revelado para cinco sistemas isoenzimáticos. Cantidades requeridas para 100 ml.....	28
Tabla 2.3. Secuencias de los “primers” utilizados para evaluación de poblaciones de girasol.....	30
Tabla 2.4. Medidas de diversidad isoenzimática de 20 poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> . $P_{0,05}$ y $P_{0,01}$: porcentaje de loci polimórficos utilizando frecuencias de 0,05 y 0,01 como criterios de polimorfismo.....	32
Tabla 2.5. Medidas de diversidad isoenzimática de <i>Helianthus annuus</i> silvestre en Argentina comparadas con valores del centro de origen y de materiales cultivados....	34
Tabla 2.6. Frecuencias alélicas por locus SSR en cuatro poblaciones silvestres y seis líneas endocriadas.....	34
Tabla 2.7. Número promedio de alelos y heterocigosis correspondiente a tres microsatélites en cuatro poblaciones de <i>H. annuus</i> silvestre y el conjunto de líneas endocriadas de girasol cultivado. (nA: número de alelos; H: heterocigosis media).....	35
Tabla 2.8. Frecuencia observada de heterocigotos (H_o), desviación del equilibrio y coeficiente de endogamia (F_{is}) en 20 poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> analizadas mediante isoenzimas.....	36
Tabla 2.9. Frecuencia observada de heterocigotos (H_o), desviación del equilibrio y coeficiente de endogamia (F_{is}) en cuatro poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> evaluadas mediante marcadores microsatélites.	37
Tabla 2.10. Número de individuos que llevan alelos típicos del girasol cultivado en poblaciones de girasol silvestre en contacto (simpátricas) y aisladas (alopátricas) del mismo	39
Tabla 2.11. Distribución de la variabilidad genética en poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> . H_t , H_s , D_{st} , G_{st} : estadísticos de Nei (1973).....	39
Tabla 3.1. Plantas estudiadas, población de origen, sitio geográfico y referencia en Fig. 3.1. Las plantas de atípicas fueron identificadas de acuerdo a la población que les dio origen P (<i>H. petiolaris</i>), A (<i>H. annuus</i>), C (girasol cultivado) y S (solitaria o aislada) las poblaciones silvestres se identifican como Ann (<i>H. annuus</i>) y Pet (<i>H. petiolaris</i>).....	47

Tabla 3.2. Germinación (%), supervivencia (%) y altura de plantas (m) en 29 familias de plantas atípicas y ocho entradas silvestres de <i>Helianthus</i> . Los números de identificación son los mismos que en la Tabla 3.1.....	50
Tabla 3.3. Caracteres categóricos en familias y especies silvestres de <i>Helianthus</i> : ramificación (0-4); tipo de hoja (Annuus, Petiolaris, Intermedio); antocianas (Presente, Ausente, % de plantas con P); color del disco (Amarillo, Rojo); color del pericarpio (Gris, Marrón, Oliva, Negro); diseño de pericarpio (Listado, Maculado, Listado-Maculado, Liso), pubescencia (1 a 4). S= segregación dentro de la familia Múltiples fenotipos dentro de una familia se presentan separados por “/”.....	56
Tabla 4.1. “Primers” microsatélites ensayados para la búsqueda de polimorfismos entre el cultivo y las plantas silvestres implantadas. TA: Temperatura de hibridación (“Annealing”).....	70
Tabla 4.2. Frecuencias netas y promedios del marcador del cultivo en la progenie silvestre para cada repetición en las cinco distancias evaluadas.....	73
Tabla 4.3. Tasa de dispersión de polen del cultivo a las parcelas de girasol silvestre, para las cinco distancias evaluadas (d) de acuerdo a las frecuencias promedio (fc) de híbridos obtenidos.....	74
Tabla 4.4. Alelos obtenidos mediante análisis de microsatélites en una población de <i>H. annuus</i> silvestre y el híbrido DK 3881.....	75
Tabla 5.1. Poblaciones estudiadas para evaluar la transferencia del carácter resistencia a herbicida (IMI).....	80
Tabla 5.2. Supervivencia luego de la aplicación de herbicida en cinco poblaciones silvestres de <i>Helianthus annuus</i> y sus descendencias. P: población pura, F ₁ : primera generación de cruzamiento con genotipo cultivado resistente, R ₁ : retrocruzas con plantas silvestres (s) y genotipo cultivado (c).....	84
Tabla 5.3. Individuos sobrevivientes a la aplicación de imazapir por categoría, como promedios de cinco poblaciones silvestres.....	85
Tabla 5.4. Diferencias en el número de plantas silvestres supervivientes por categoría y por sitio de recolección. Por encima de la diagonal se encuentran las F ₁ , por debajo las R _{1c} , diferencias significativas para p<0,05 (*), para p<0,01 (**) y no significativas (ns).....	85
Tabla 5.5. Caracteres reproductivos de las poblaciones de <i>H. annuus</i> silvestre y sus respectivas F ₁ , R _{1c} , R _{1s} y PL por cruzamiento con el híbrido comercial IMI resistente DK 3880CL. Medias seguidas de distinta letra indican diferencias altamente significativas (p<0,01) luego de la prueba de Kruskal-Wallis.....	87

Tabla 5.6. Número de semillas llenas, diámetro del capítulo (cm), % de semillas y número de capítulos por planta en poblaciones de *Helianthus annuus* y sus cruzas. medias seguidas de distinta letra indican diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) luego de la prueba de Kruskal-Wallis.....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Población de <i>Helianthus annuus</i> spp. <i>annuus</i> a) en Diamante, Entre Ríos b) en Las Malvinas, Mendoza.....	22
Figura 1.2. Población de <i>Helianthus petiolaris</i> en a) Atreucó, La Pampa b) Saliqueló, Buenos Aires.....	23
Figura 1.3. Mapa de distribución geográfica de especies silvestres de <i>Helianthus</i> en Argentina, <i>H. annuus</i> spp. <i>annuus</i> y <i>H. petiolaris</i> . Cada símbolo representa un departamento provincial donde existen poblaciones estables. El área sombreada corresponde a la región de cultivo de girasol.....	24
Figura 2.1. Zimogramas de <i>H. a. annuus</i> y tres genotipos cultivados (1: 3915; 2: HA89; 3: 3900) a) Esterasa (Est-1) y Fosfatasa Acida (Acp-1). b) Alcohol Dehidrogenasa (Adh-1, Adh-2) y Glutamato Dehidrogenasa (Gdh-2).....	33
Figura 2.2. Patrón de amplificación de microsátélites obtenido utilizando el “primer” ORS-297 para las poblaciones de Río Cuarto y Juárez Celman y seis líneas endocriadas (L1: HAR2, L2: RHA 274, L3: HAR 5, L4: HAR 3, L5: HA 369, L6: HA89).....	35
Figura. 2.3. Análisis de agrupamiento de 20 poblaciones de <i>Helianthus annuus</i> basado en la distancia genética de Rogers sobre datos de frecuencias isoenzimáticas. Los códigos corresponden a las poblaciones de la Tabla 2.1.....	38
Figura 3.1. Distribución de poblaciones silvestres de <i>Helianthus</i> donde se colectaron plantas de morfología intermedia, referenciadas mediante GPS con el programa Ozi Explorer Las referencias son detalladas en Tabla 3.1.....	46
Figura 3.2. Caracteres morfológicos métricos (medias y desvíos estándar) en familias de plantas atípicas, entradas de <i>H. petiolaris</i> y <i>H. annuus</i> y el cultivar DK3881. Los colores identifican los distintos materiales: Amarillo: plantas aisladas, Rojo: plantas halladas en una población de <i>H. petiolaris</i> , Gris: Planta hallada en un cultivo de girasol, Rosa: planta hallada en una población de <i>H. annuus</i> , Azul: poblaciones de <i>H. petiolaris</i> , Verde: poblaciones de <i>H. annuus</i> , Marron: Girasol cultivado.	51
Figura 3.3. Caracteres de fertilidad en familias de plantas de morfología intermedia, accesiones de <i>H. petiolaris</i> y <i>H. annuus</i> y el cultivar DK3881. Los colores identifican los distintos materiales Código de colores como en la figura 3.2.....	53
Figura 3.4. Androesterilidad observada en las familias descendientes de las plantas de morfología intermedia.....	54

- Figura 3.5.** Análisis de componentes principales (CPA) de las 29 progenies evaluadas (P1-P21; S1-S10; A1; C1), ocho poblaciones silvestres de *H. annuus annuus* (Ann1-4) y *H. petiolaris* (Pet1-4) y un genotipo cultivado (Cu).....54
- Figura 3.6.** Aspecto variable del pericarpio en semillas de descendencias de plantas atípicas: listado maculado (a), maculado (b), listado (c), glabro (a y c) y pubescente (b).....56
- Figura 3.7.** Índice híbrido basado en caracteres categóricos de *Helianthus* silvestres, girasol cultivado y progenies de 29 plantas atípicas. a) *H. annuus* silvestre. b) *H. petiolaris*.....58
- Figura 3.8.** Análisis procrustes de las familias (P1-P21 rojo; S1-S10 amarillo; C gris; A rosa) y las entradas silvestres (Ann 1-4 verde; Pet 1-4 violeta). Las formas corresponden a las clases conformadas según su fertilidad, de menor a mayor: Clase 1= óvalos, Clase 2= rectángulos, Clase 3= triángulos, Clase 4= cruces.....59
- Figura 4.1.** Diseño experimental comprendido por una parcela central del híbrido comercial DK3881, circundada por 18 parcelas de *H. a. annuus* a distancias de 3, 100, 300, 500 y 1000 m.....67
- Figura 4.2.** Parcela central de girasol cultivado y plantas de *H. annuus* silvestre ubicadas a 3 m de distancia, protegidas por jaula de red.....68
- Figura 4.3.** Zimogramas de Fosfatasa ácida (locus Acp-1) a. Población C12 y alelo característico del girasol cultivado, Acp1-e (c) b. Progenie de poblaciones silvestres creciendo a 3 m del cultivo, mostrando híbridos silvestre-cultivo (h).....72
- Figura 4.4.** Frecuencias del marcador del cultivo en la progenie silvestre evaluada. Cada punto representa la media y el desvío estándar correspondiente a la distancia a la que se hallaba cada población silvestre de la parcela central del cultivo (N= 40-45 plantas por distancia).....73
- Figura 4.5.** Estimación de la tasa de dispersión de polen desde la parcela central de cultivo hacia las poblaciones silvestres para las cinco distancias evaluadas.....74
- Figura 5.1.** Población de girasol silvestre en estadio de cuatro hojas. a) Previo a la aplicación del herbicida b) Plantas supervivientes luego de la aplicación del herbicida.....81
- Figura 5.2.** Plantas de girasol silvestre luego de la aplicación del herbicida a) Síntomas de fitotoxicidad: clorosis y muerte de ápice. b) Híbrido DK3880CL y poblaciones silvestres susceptibles.....82
- Figura 5.3.** Regresión del número de semillas y el diámetro del capítulo en plantas silvestres de *H. annuus* (símbolos negros) y F₁ del cruzamiento con un híbrido comercial IMI resistente (símbolos grises).....89

Figura 5.4. Regresión del número de semillas y el diámetro del capítulo en retrocruzas con ambos padres, cultivado (R_{1c} , símbolos negros) y silvestre (R_{1s} , símbolos grises).....89

Figura 5.5. Recuperación del número de semillas por capítulo por retrocruza con respecto a F_1 . a) Retrocruza con el parental cultivado, R_{1c} (símbolos negros) y F_1 (símbolos grises). b) Retrocruza con el parental silvestre, R_{1s} (símbolos negros) y F_1 (símbolos grises).....90

RESUMEN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los cultivos más importantes de Argentina. La superficie sembrada se ha reducido en los últimos diez años, con el advenimiento de los cultivos genéticamente modificados como la soja, más rentables para los productores agrícolas. Desde entonces se han realizado grandes esfuerzos para recuperar el nivel de producción del cultivo de girasol. Una limitante para la introducción de nuevas tecnologías en este cultivo tradicional es la presencia de parientes silvestres sexualmente compatibles, potenciales receptores de polen, en el área dedicada al cultivo de girasol. *Helianthus annuus* y *H. petiolaris*, especies silvestres anuales, diploides y autoincompatibles se han establecido en Argentina en los últimos 60 años. La primera fue introducida intencionalmente como forrajera mientras que la segunda entró probablemente como un contaminante de semillas. Más tarde fueron importadas desde EEUU como fuente de germoplasma para conferir resistencia a patógenos en el mejoramiento de variedades de girasol. Actualmente, ambas especies se encuentran naturalizadas en la región central de Argentina, superponiéndose ampliamente con el área del cultivo.

Los objetivos generales de esta tesis fueron obtener información acerca del rango de dispersión de las poblaciones silvestres de girasol en Argentina, estudiar la hibridación y potencial flujo génico entre ellas y el girasol cultivado; en ese caso, estimar la probabilidad de modificación de la aptitud biológica de las poblaciones silvestres que pudiera producir el flujo génico proveniente de las nuevas variedades de girasol.

Para ello se realizaron exploraciones y actividades experimentales que permitieran: describir la morfología y distribución de las poblaciones de ambas especies silvestres; comparar la variabilidad genética de marcadores moleculares en poblaciones silvestres procedentes de distintas regiones; identificar caracteres morfológicos intermedios y analizar la fertilidad en plantas presuntamente híbridas; estimar la frecuencia de cruzamientos y tasa de flujo génico desde el girasol domesticado hacia *H. annuus* silvestre mediante análisis de marcadores moleculares; estudiar la transferencia del carácter resistencia a imidazolinonas desde el cultivo de girasol a *H. annuus* silvestre y evaluar su efecto sobre la supervivencia y la fecundidad.

Se encontraron numerosas poblaciones de *Helianthus annuus* en las provincias de Córdoba, La Pampa, Buenos Aires, Entre Ríos, Mendoza, San Luis y San Juan. En tanto *H. petiolaris* fue hallada principalmente en las provincias de La Pampa, San Luis y el oeste de Buenos Aires, sobre suelos arenosos. Ambas especies pueden hibridar con el girasol domesticado y se hallaron plantas con morfología intermedia en 15 departamentos provinciales. Las especies silvestres también son simpátricas en numerosas localidades de la región central del país.

La variación genética en 20 poblaciones silvestres y en comparación con el girasol domesticado se investigó mediante marcadores isoenzimáticos y microsatélites (SSR). Los valores de diversidad hallados en este estudio para *H. annuus* fueron $A=1,6$, $P=0,43$ y $H=0,17$, levemente menores a los informados en su centro de origen y similares a los encontrados en Australia donde *H. annuus* silvestre fue introducido con fines ornamentales.

La progenie de 33 plantas atípicas coleccionadas en 14 sitios representativos del área de difusión fue estudiada para confirmar su origen híbrido. Supervivencia, germinación, rasgos morfológicos y días a floración confirmaron la hibridación entre el cultivo y ambas especies silvestres cuando las familias fueron comparadas con ocho entradas silvestres. Algunas plantas se identificaron como presuntos híbridos entre *H. annuus* domesticado y ambas especies silvestres, otras como generaciones avanzadas de un genotipo cultivado. A partir del análisis de progenies se determinaron cuatro clases de híbridos de acuerdo a su grado de fertilidad, demostrando que la hibridación y el flujo génico son fenómenos recurrentes entre estas especies en la región central de Argentina.

Con el propósito de cuantificar el flujo génico entre el girasol cultivado y silvestre se sembró un campo experimental de girasol circundado por parcelas de girasol silvestre a distancias crecientes. La tasa de hibridación se estimó utilizando un marcador isoenzimático específico de la variedad cultivada. El promedio de híbridos silvestre-cultivo hallado entre la progenie fue de 7%. Las frecuencias más altas de flujo génico (18%) se encontraron en las parcelas más cercanas al cultivo (3m) y decrecieron gradualmente hasta los 500m.

La tecnología Clearfield (resistencia a herbicidas de la familia imidazolinonas) ha sido incorporada en los últimos años en los híbridos comerciales argentinos. Este

rasgo resultó adecuado para estudiar los cambios en la aptitud biológica y el posible impacto ambiental que generaría la transferencia de genes desde el cultivo a sus parientes silvestres. Se utilizaron cinco poblaciones de *H. annuus* silvestre que comprendían el rango de distribución de la especie. Se registró un promedio de 2% de sobrevivientes en 301 plantas de girasol silvestre evaluadas, mientras que la supervivencia de F₁ aumentó a 38% sobre un total de 350 plantas. Las retrocruzas con ambos parentales mostraron valores de resistencia al herbicida superiores a 80%. La aptitud biológica medida en todas las generaciones demostró que si bien los híbridos F₁ poseían baja fertilidad (estimada mediante la producción de semilla), en las siguientes generaciones se recuperaba la producción de semillas viables.

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the main crops in Argentina. In the last ten years a reduction in the cultivated acreage took place as some genetic modified crops like soybean became more profitable for the farmers. Since then many efforts have been made to recover the yield levels of sunflower crop. One caveat to introduce new technologies in this traditional crop is the presence of wild relatives, potentially recipients of crop genes through pollen flow. *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*, two annual, diploid and self-incompatible wild species were established in Argentina in the last 60 years. The former was intentionally introduced as a forage species while the latter probably entered as a seed contaminant. Later, both species were imported from USA as germplasm sources to confer pathogen resistance to sunflower varieties. At present, both wild species are naturalized and widespread over the central part of Argentina where they extensively overlap the sunflower crop region.

The goals of the present study were to obtain information about the dispersion range of wild sunflower populations in Argentina, to study hybridization and potential gene flow between them and the cultivated sunflower, and in such situation, to estimate the likelihood of fitness modification in wild populations due to gene flow from the novel sunflower varieties.

Explorations and experimental activities were done in order to describe the morphology and population distribution of both wild species; to compare genetic variability of molecular markers in wild populations from different places; to identify intermediate morphological characters and to study fertility in presumed hybrid plants; to estimate hybridization frequencies and gene flow rates from domesticated sunflower to wild *H. annuus* through molecular marker analysis; to study the transference of the imidazolinone resistant trait from the crop to wild *H. annuus*, and to evaluate its effects upon survival and fecundity.

Several wild *Helianthus annuus* populations were found in the provinces of Córdoba, La Pampa, Buenos Aires, Entre Ríos, Mendoza, San Luis and San Juan; while *H. petiolaris* was mainly found on sandy soils in La Pampa, San Luis and western Buenos Aires. Both species can hybridize with the domesticated sunflower and morphologically intermediate plants were found in 15 counties. These wild species are also sympatric in several localities in the central part of the country.

Genetic variation in 20 wild populations as compared with domestic sunflower was assessed through isozyme and SSR markers. *H. annuus* diversity values were $A=1.6$, $P=0.43$, and $H=0.17$, slightly lower than levels reported for the center of origin and similar to those found in Australia, where wild *H. annuus* was introduced with ornamental purposes.

The progeny of 33 off-type plants collected in 14 representative sites of the diffusion area were studied to confirm their hybrid origin. Survival, germination, morphological traits and days to flowering confirmed hybridization between the crop and both wild species, when families were compared with eight accessions of typical wild plants. Some progenies were presumably crop-wild *H. annuus* and *H. petiolaris* hybrids, and others were advanced generations of a cultivated genotype. From progeny tests, four classes of hybrids were defined mainly according to fertility levels, showing that hybridization and gene flow are recurrent events among these species in the central part of Argentina.

In order to measure gene flow between cultivated and wild sunflower, an experimental stand of sunflower was sown surrounded by plots of wild plants at increasing distances. Hybridization rates were estimated using a crop specific isozyme marker. A mean of 7% progenies were crop-wild hybrids. The highest percentage (18%) of gene flow was found among the nearest wild plants (3 m) from the crop and gradually decreased with distance, up to 500 m.

The Clearfield technology (resistance to imidazolinone herbicides) has been incorporated to Argentinean commercial hybrids in the last years. This trait was suitable to study fitness changes and the likely environmental impact produced by gene transfer from the crop to its wild relatives. Five populations of wild *H. annuus* comprising the species distribution range were used in this study. A mean of 2% surviving wild sunflower plants among 301 screened was found, whereas survival of F_1 plants increased to 38% among 350 screened plants. Backcrosses with both cultivated and wild parents showed more than 80% of IMI-resistant offspring. Fitness in all evaluated generations demonstrated that although F_1 progenies had low fertility (assessed through seed set), viable seed production was recovered in the following generations.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Helianthus* (Asteraceae) es nativo de América del Norte y comprende 51 especies anuales y perennes, diploides, tetraploides y hexaploides, con un número cromosómico básico de $x=17$ (Heiser 1978; Seiler y Rieseberg 1997; Jan y Seiler 2007). El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*) es la especie domesticada más importante del género, anual y diploide ($2n=2x=34$). Es una importante fuente de aceite vegetal de alta calidad, por su alto contenido de ácidos grasos no saturados, especialmente oleico y linoleico, alto valor calórico y nutritivo y su contenido en provitaminas y vitaminas liposolubles. Ha sido tradicionalmente uno de los cultivos más importantes de Argentina. Los primeros híbridos comerciales de girasol fueron liberados en el país a principios de la década de 1970, luego del descubrimiento de la androesterilidad citoplasmática (Leclercq 1969) y los genes restauradores de fertilidad (Kinman 1970), lo que permitió la producción de semilla híbrida en gran escala. Dos tipos de híbridos coexistían en el mercado entre 1970 y 1980, los de semilla estriada, de maduración intermedia a tardía, con una baja concentración de aceite pero una gran producción y los de semilla lisa color negra, de maduración intermedia a temprana y altos contenidos de aceite, pero bajo rendimiento. Los primeros tipos fueron originados mayoritariamente por germoplasma proveniente de variedades de polinización abierta, mientras que los segundos derivaron de germoplasma proveniente de EEUU y Europa del Este. Estos híbridos convergieron en un único producto que combinaba ambas características (de la Vega *et al.* 2007). A fines de la década de 1990 el área de girasol sembrada superó los 3,5 millones de hectáreas, con una producción de 6,5 millones de toneladas. Argentina se ubicó como primer exportador mundial con una participación del 60% del mercado internacional y 1,7 millones de toneladas de aceite de girasol exportado, sobre un total de 3 millones comercializadas en el mundo. En las campañas subsiguientes se registró una fuerte reducción en la producción del cultivo. Durante el ciclo 2008/09 la producción alcanzó unos 2,45 millones de toneladas, siendo la causa principal de esta disminución la reducción en el área sembrada. Durante el transcurso de los últimos años hubo un incremento considerable del cultivo de soja, que desplazó al girasol hacia zonas menos favorables, como el sudoeste de la planicie central (de la Vega *et al.* 2007), causando una reducción en la producción del cultivo. Durante la última campaña la siembra de girasol en Argentina se redujo a 2,12 millones de hectáreas, menos del 50% del área récord alcanzada en la década anterior.

El notable avance del cultivo de soja se debe a la incorporación de variedades transgénicas y la siembra directa, mientras que no ha ocurrido lo mismo con el girasol, determinando una expansión de la primera en detrimento del segundo. Si bien la misma tecnología podría beneficiar al girasol de hecho existen cerca de 80 eventos de transformación de girasol autorizados para pruebas a campo que incorporan resistencia a lepidópteros, tolerancia a glifosato y resistencia a enfermedades fúngicas el uso de cultivares genéticamente modificados no se ha concretado. En Argentina, los productores agrícolas han adoptado masivamente la biotecnología en los últimos 10 años. Actualmente el 94% del algodón, el 83% del maíz y casi la totalidad de la producción de soja son transgénicos sobre un total de 19,86 millones de hectáreas (Argenbio 2009) situando al país en segundo lugar a nivel mundial en cuanto a producción de cultivos genéticamente modificados (GM) luego de EEUU (MAGyP 2009). Asimismo, se encuentra entre los principales productores mundiales de girasol, siguiendo a Rusia y Ucrania. Ninguna variedad de girasol genéticamente modificada ha sido liberada para su comercialización, en parte debido a que este cultivo, a diferencia de los que tienen autorización comercial en el país, tiene parientes silvestres que se desarrollan y florecen en sincronía en las áreas de producción. Los riesgos potenciales que podría acarrear para el ambiente la posibilidad de transferencia de genes de resistencia a herbicidas y/o plagas a especies silvestres por vía de cruzamientos interespecíficos han sido motivo de creciente preocupación desde el advenimiento de la biotecnología (Snow y Moran Palma 1997).

La nueva región dedicada al cultivo de girasol coincide con el área de distribución de dos especies silvestres del género, *Helianthus annuus* L., considerado el antecesor del girasol domesticado y *H. petiolaris* Nutt., que se han dispersado a través de nuestro país en los últimos 60 años (Covas 1966, Poverene *et al.* 2002). Actualmente, se encuentran naturalizadas y difundidas en la región central de Argentina, son simpátricas en numerosas localidades y en gran parte de la superficie de cultivo de girasol (Poverene *et al.* 2002). Son especies anuales, diploides y autoincompatibles (Rogers *et al.* 1982). La polinización es favorecida por abejas y en menor medida por otros himenópteros y lepidópteros. *H. annuus* muestra una gran variabilidad morfológica y corresponde a la subespecie *annuus* (Heiser 1954). El rango de dispersión de esta especie es mayor a la de *H. petiolaris*, comprendiendo diferentes tipos de suelos (Cantamutto *et al.* 2008). Se encontraron poblaciones naturalizadas de esta especie en siete provincias centrales de la Argentina alcanzando altas densidades poblacionales en el sur de Córdoba y este de la Pampa (Poverene *et al.* 2002). Posee un sistema de fecundación cruzada, gobernado principalmente por

alelos de autoincompatibilidad (Rogers *et al.* 1982). *H. annuus* y *H. petiolaris* son especies muy adecuadas para el estudio de la hibridación interespecífica, introgresión y el mantenimiento de diferencias específicas (Strasburg y Rieseberg 2008). Ambas difieren en un mínimo de 11 arreglos cromosómicos (Burke *et al.* 2004), son morfológica y ecológicamente diferentes (Gross *et al.* 2004; Rosenthal *et al.* 2005), poseen fuertes barreras precigóticas (Rieseberg *et al.* 1995a) y postcigóticas (Lai *et al.* 2005) a la hibridación. A pesar de ello, en su centro de origen conforman numerosas zonas híbridas a través de su rango de distribución y la producción de híbridos en dichas zonas suele ser muy alta (Rieseberg *et al.* 1998), como así también los genotipos generados por retrocruzas (Rieseberg *et al.* 1999c). Esto podría conferirles la posibilidad de recombinación entre ambas y el desacoplamiento de regiones adaptativas del genoma que contribuyan al aislamiento de las especies (Rieseberg *et al.* 1999c). No obstante, han dado lugar a tres especies híbridas homoploides en el sudoeste de EEUU (Rieseberg 2006).

La historia de la difusión del girasol en el mundo incluye un centro de origen y de domesticación en América del Norte, la introducción en Europa durante el siglo XVI, difundiéndose gradualmente hacia Rusia como cultivo oleaginoso y la reintroducción en América en la segunda mitad del siglo XIX (Seiler y Rieseberg 1997). Cada uno de esos eventos en la historia de los cultivares modernos de girasol pudo haber impuesto un cuello de botella de modo que la diversidad genética resultara fuertemente asociada con el grado de selección agronómica (Cronn *et al.* 1997). Las especies silvestres constituyen una valiosa fuente de variación genética para la incorporación de caracteres de importancia para el mejoramiento genético del girasol cultivado, como la androesterilidad (Leclercq 1969), la resistencia a patógenos (Cialzeta y Antonelli 1971) y la tolerancia a herbicidas (Al-Khatib *et al.* 1998). De allí que resulta de particular interés el estudio de la diversidad genética de las poblaciones locales de *H. annuus*, en relación a la variabilidad observada en el centro de origen y en materiales cultivados.

Algunas poblaciones de girasol silvestre se encuentran en zonas productoras de girasol, dentro de los lotes o a la vera de ellos. Allí se observan con frecuencia plantas con características morfológicas intermedias entre el girasol y las especies silvestres.

La existencia de flujo génico entre el girasol cultivado y especies silvestres del género *Helianthus* ha sido documentada en sus centros de dispersión en América del Norte, donde varias especies silvestres se comportan como malezas de los cultivos de verano y dan origen a “enjambres híbridos” con el girasol cultivado (Arias y Rieseberg 1994; Whitton *et al.* 1997; Linder *et al.* 1998; Snow *et al.* 1998; Rieseberg *et al.* 1999b). Asimismo, la evidencia morfológica y de marcadores moleculares sugieren que *H. annuus* silvestre hibrida naturalmente con otras especies silvestres de girasol en las regiones donde son simpátricas (Heiser 1978, Rogers *et al.* 1982, Dorado *et al.* 1992). La probabilidad de hibridación espontánea entre el girasol domesticado y las especies silvestres relacionadas es favorecida por la coincidencia en los períodos de floración, por compartir los mismos polinizadores y por la autoincompatibilidad de las especies silvestres (Schilling y Heiser 1981, Rogers *et al.* 1982, Keeler y Turner 1990). La hibridación de *H. annuus* silvestre con el girasol es posible en toda el área de cultivo de EEUU y se ha encontrado evidencia morfológica hasta en un tercio de las poblaciones examinadas por campaña agrícola (Burke *et al.* 2002a). La facilidad de hibridación con el girasol cultivado se debe a que pertenecen a la misma especie y se ha comprobado la posibilidad de hibridación a distancias superiores a los 1000 m en México (Arias y Rieseberg 1994). La frecuencia de hibridación entre *H. annuus* cultivado y silvestre alcanza 42% (Whitton *et al.* 1997) y los alelos del girasol cultivado persisten en frecuencias de hasta 38% en las poblaciones silvestres simpátricas (Linder *et al.* 1998). Los híbridos entre girasol domesticado y silvestre son vigorosos y fértiles (Snow *et al.* 1998).

El escape de genes de un cultivo a sus parientes silvestres puede ser evaluado en condiciones naturales mediante el análisis de caracteres morfológicos y de fertilidad y mediante la detección de marcadores específicos del cultivo en poblaciones de las especies silvestres. Para ello deben compararse poblaciones silvestres que han crecido en la vecindad de lotes cultivados con poblaciones alejadas de las regiones de cultivo (Hails y Morley 2005).

Helianthus annuus ssp. *annuus* es una importante maleza de cultivos de maíz, soja, trigo y remolacha azucarera en América del Norte y resultaba difícil de controlar antes del advenimiento de los herbicidas de la familia de las imidazolinonas y sulfonilureas (Al-Khatib *et al.* 1998). El mecanismo de acción de estos herbicidas se basa en la inhibición de la actividad de la acetolactato sintasa (ALS), enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos de cadena lateral ramificada,

valina, leucina e isoleucina (Duggleby y Pang 2000). Estos aminoácidos son esenciales para el desarrollo de las plantas, su ausencia provoca la falta de crecimiento tanto de las raíces como del tallo, llevándolas eventualmente a la muerte (Devine *et al.* 1993). Los herbicidas que inhiben la síntesis de tales aminoácidos son ampliamente utilizados por ser efectivos en bajas dosis, poseer baja toxicidad, controlar un amplio espectro de malezas y poseer alta eficacia (Tan *et al.* 2005). Se han encontrado 83 especies de malezas que desarrollaron resistencia a inhibidores de la ALS, un valor mayor al encontrado para el resto de los herbicidas (Gressel y Segel 1978, Tranel y Wright 2002, Heap 2003). Las distintas especies difieren en la susceptibilidad a estos principios activos y pueden desarrollar resistencia a diferentes inhibidores de ALS. Generalmente la resistencia se debe a mutaciones puntuales en genes que codifican ALS y reducen la sensibilidad de la enzima al herbicida inhibidor (Umbarger 1978, Jander *et al.* 2003). Las mutaciones espontáneas que confieren resistencia a inhibidores de ALS pueden incrementar rápidamente su frecuencia en las poblaciones silvestres bajo una fuerte selección provocada por el herbicida (Tranel y Wright 2002). Poblaciones de girasol silvestre resistentes fueron descubiertas en 1996 en Kansas (Al Kathib *et al.* 1998) en campos que habían sido tratados durante 7-8 años con dichos herbicidas. Se observó resistencia cruzada a inhibidores de ALS en poblaciones de girasol silvestre pertenecientes a South Dakota (White *et al.* 2002) y Kansas (Baumgartner *et al.* 1999b). La transferencia de resistencia a herbicidas desde los cultivos a las especies silvestres resulta de interés, ya que si las malezas adquieren resistencia a los herbicidas utilizados, los mismos dejan de cumplir su función y deben ser reemplazados por nuevas tecnologías.

En los últimos años Argentina ha incorporado la resistencia a imidazolinonas en el cultivo de girasol. En la campaña 2006/07 se produjo un aumento en el uso de híbridos resistentes, duplicando su utilización a nivel nacional, respecto de la campaña precedente con el 10% de la superficie implantada (MAGyP 2009). Dado que la superficie utilizada para el cultivo coincide con el área de dispersión de las especies silvestres emparentadas, la utilización masiva de esta nueva tecnología podría favorecer la transferencia del rasgo. La mayor preocupación asociada a la utilización de cultivos resistentes a herbicidas es el riesgo de introducción de genes relacionados con la aptitud biológica en los parientes silvestres, dando como resultado malezas más invasivas (Snow y Moran Palma 1997; Arriola y Ellstrand 1997; Ellstrand *et al.* 1999). La aptitud biológica se define como el potencial desarrollo exitoso de un genotipo basado en su supervivencia, habilidad competitiva y éxito reproductivo, donde el

individuo más apto es aquel que dejará mayor descendencia contribuyendo con una mayor proporción de sus genes en el *pool* génico de la población (Radosevich *et al.* 1997). La hibridación entre girasol cultivado y silvestre permite el movimiento de transgenes con diferentes consecuencias sobre la aptitud biológica, resultando en caracteres neutrales (Burke y Rieseberg 2003) o ventajosos (Snow *et al.* 2003). El uso de nuevas variedades resistentes a herbicidas como las imidazolinonas y las variedades genéticamente modificadas (GM) podría colocar nuevamente al girasol como uno de los cultivos principales de Argentina. Sin embargo, la resistencia a herbicidas podría ser conferida al girasol silvestre desde variedades no-GM resistentes a imidazolinonas. El uso generalizado de esas variedades podría resultar en la aparición de nuevos biotipos de girasol silvestre resistentes a herbicidas, por selección y flujo génico (Marshall *et al.* 2001; Kolkman *et al.* 2004). La resistencia a herbicidas inhibidores de ALS se disemina rápidamente en poblaciones de girasol silvestre (Baumgartner *et al.* 1999a).

El objetivo principal de esta tesis fue conocer la difusión de las especies de girasol silvestre en la Argentina y su potencial flujo génico con el girasol cultivado. El estudio de situación y la primera evaluación de flujo génico se realizaron sobre ambas especies, pero los estudios moleculares y de aptitud biológica se centraron en *H. annuus* por ser esta especie la más susceptible a la modificación genética por flujo mediado por polen desde el girasol cultivado.

Se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- El área de dispersión de las especies silvestres en Argentina es muy importante y el tamaño de las poblaciones fluctúa a través de los años debido a las prácticas agrícolas.
- Durante el proceso de introducción las poblaciones atravesaron cuellos de botella que provocaron una disminución de la variabilidad genética respecto de las poblaciones en el centro de origen.
- Las plantas de morfología intermedia observadas en los viajes de recolección podrían ser F1 de cruzamientos interespecíficos, productos de retrocruzas o generaciones avanzadas. Si en efecto son presuntos híbridos de *H. annuus* x *H. petiolaris* o *H. annuus* silvestre x cultivado, esto podría diagnosticarse a partir de caracteres morfológicos y del análisis de fertilidad.

- En poblaciones silvestres se encontrarían alelos característicos de líneas o híbridos de girasol, que provienen de introgresión de genes de girasol cultivado en la especie silvestre.
- Un marcador genético característico del girasol cultivado sería detectable en las plantas de *H. annuus* silvestres en función de la frecuencia con que es transmitido por polinización y de la distancia de dispersión del polen.
- El carácter resistencia a imidazolinonas podría ser transferido a las especies silvestres y conferirles una mayor aptitud biológica, posibilitando su conversión en malezas de difícil control.

En consecuencia, los objetivos específicos fueron:

- Describir la morfología y distribución de las poblaciones de *H. annuus* silvestre y *H. petiolaris* que se encuentran naturalizadas en Argentina.
- Identificar caracteres morfológicos intermedios y analizar la fertilidad en plantas presuntamente híbridas.
- Comparar la variabilidad genética de marcadores moleculares en poblaciones silvestres procedentes de distintas regiones, centrando la búsqueda en aquellos marcadores característicos del cultivo.
- Comparar la composición alélica de poblaciones silvestres simpátricas y alopátricas con el cultivo de girasol.
- Estimar la frecuencia de cruzamientos y tasa de flujo génico desde el girasol cultivado hacia la especie silvestre mediante análisis de marcadores moleculares.
- Estudiar la transferencia del carácter resistencia a imidazolinonas desde el cultivo de girasol a *H. annuus* silvestre y evaluar su efecto sobre la supervivencia y la fecundidad.

Capítulo I

El girasol silvestre en Argentina

Las especies anuales *Helianthus annuus* L. y *H. petiolaris* Nutt. fueron descritas como adventicias en la República Argentina en la década de 1960 (Cabrera 1963; Covas 1966). Cabrera (1974) menciona a *H. petiolaris* como en vías de naturalización y a *H. annuus* como frecuente sub-espontánea escapada del cultivo, pero nunca naturalizada. En un informe de circulación restringida, González Roelants *et al.* (1997) describieron la distribución de especies silvestres del género *Helianthus* en las provincias de La Pampa y Buenos Aires. Luego *H. annuus* y *H. petiolaris* fueron citadas como naturalizadas en las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Entre Ríos (Zuloaga y Morrone 1999). Las plantas de *H. annuus* descritas concuerdan con plantas voluntarias de girasol, nacidas espontáneamente de semilla de girasol cultivado perdida durante la cosecha y el transporte. Sin embargo, no fue sino hasta recientemente que se describieron poblaciones silvestres de *H. annuus* que difieren de las plantas anteriormente mencionadas (Poverene *et al.* 2002, 2008). En los últimos 30 años ambas especies anuales han encontrado en el país un ambiente propicio para su difusión, se han establecido en al menos siete provincias y continúan en expansión (Poverene *et al.* 2002). Los primeros registros indicarían que *H. annuus* fue introducida hacia 1948 en Río Cuarto, Córdoba para alimentación de animales (Bauer 1991). En tanto, *H. petiolaris* se encontró por primera vez como una población silvestre en Catrillo, La Pampa en 1954 (Covas 1966) y probablemente fue introducida como contaminante de lotes de semilla de especies forrajeras importadas desde Texas (M.Sc. A. Luciano, comunicación personal a Mónica Poverene). Más tarde, ambas especies silvestres se importaron de EEUU como recurso de germoplasma para conferir resistencia a patógenos en genotipos cultivados (Bertero y Vázquez 2003).

El objetivo de este capítulo es describir la morfología y distribución de ambas especies en Argentina, a fin de delimitar las regiones donde podría tener lugar flujo génico con el cultivo, con el riesgo potencial de modificación de las poblaciones silvestres existentes.

Materiales y Métodos

Durante los años 2000 a 2005 participé de algunos de los 26 viajes de colección realizados por mi grupo de trabajo, entre los meses de enero y abril, en las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba, San Luís, Mendoza, San Juan, Entre Ríos, Santa Fe y Chaco. Durante estos viajes se prest  especial atención a las regiones de cultivo del girasol. Se situaron geográficamente las poblaciones de *Helianthus* mediante mapas de las provincias y departamentos provinciales, con ayuda de un posicionador satelital (GPS). Se recolectaron materiales de herbario y muestras de capítulos por planta y del conjunto de cada población, en 135 localidades para *H. petiolaris* y 90 para *H. annuus*. En poblaciones estables (encontradas al menos durante tres años seguidos) se tomaron asimismo muestras de suelo del lugar.

Para la clasificación sistemática de los materiales se utilizó información de Cabrera (1963, 1974), Rogers *et al.* (1982), Seiler y Rieseberg (1997) y notas de Covas (1966, 1984), Heiser (1954, 1976) y Troiani y Steibel (1999).

Resultados

Descripción de las especies silvestres

Helianthus annuus

Se observó esta especie en sus dos formas: tipo silvestre y tipo subespont nea. Esta última concuerda con los materiales adventicios descritos por Cabrera (1963, 1974, 1978).

Tipo silvestre: Corresponde al fenotipo morfológico de los individuos que forman las poblaciones más extensas; también se han encontrado plantas aisladas que responden al mismo.

Son plantas anuales, de 1m a más de 3m de altura, ramificadas a muy ramificadas en el tercio superior, tallos usualmente h spidos, con o sin antocianinas. Tienen las hojas generalmente alternas, aovadas u ovado-lanceoladas, conspicuamente aserradas, las hojas basales son cordadas a subcordadas, generalmente híspidas en ambas caras, 10 a 30cm de largo, 5 a 30cm de ancho, largamente pecioladas. Los capítulos con discos de 1,5 a 5cm de diámetro o mayores,

sobre pecíolos largos, generalmente curvados en S; filarias aovadas u ovado-lanceoladas, abruptamente atenuadas, hirsutas, híspidas o raramente glabras en el envés, ciliadas en los márgenes, 5 a 10 mm de ancho o más. Las lígulas en número de 17 o más, raramente menos, usualmente 2,5 cm de largo o mayores, usualmente amarillas pero con distintas tonalidades; lóbulos de las corolas rojizos o púrpura, ocasionalmente amarillos, páleas profundamente 3-cuspidadas, cúspides medias atenuadas, híspidas o raramente glabras cerca del ápice, mucho mayores que el fruto, cipselas de 4 a 5 mm de largo, raramente más, glabras o algo hirsutas, de varios colores (generalmente negro, gris, blanco, rojizo o listado.); papus usualmente con dos pequeñas aristas (Fig. 1.1).

Tipo sub-espontáneo: Corresponde a las plantas voluntarias que crecen en banquinas y lotes sin cultivar pero nunca formando poblaciones extendidas. Su fenotipo se asemeja al del girasol cultivado híbrido o sus descendientes y es el único tipo descrito en la literatura argentina citada precedentemente. Los caracteres que lo distinguen del tipo silvestre son:

Plantas anuales, de hasta unos 2 m de altura, pero usualmente menos de 1 m, tallo simple o cortamente ramificado, escabroso, sin antocianas; hojas alternas aovadas a cordadas, pecioladas, de 10 a 20 cm de ancho, raramente más, aserradas en los márgenes, ásperas; capítulos grandes, con discos de 10 cm o más de diámetro, mayor el del tallo principal, sobre pecíolos no curvados en S; filarias de 10 mm o más de ancho; lóbulos de las corolas del disco amarillos; páleas levemente mayores que el fruto; cipselas glabras, negras, listadas o blancas, usualmente de 8 a 15 mm de largo.

Helianthus petiolaris

Son plantas anuales, 0,2 a más de 1 m. de altura, muy ramificadas desde la base, con tallos híspidos o escabrosos a casi glabros; hojas alternas aovado-deltoides, lanceolado-deltoides a lanceoladas, enteras o algo aserradas, cuneadas o truncadas en la base, 2 a 10 cm de largo, 1 a 5 cm de ancho, rugosas en ambas caras, frecuentemente verde-azuladas, pecioladas; pedúnculos de 3 a más de 30 cm de largo, capítulos de 1 a 2,5 cm de diámetro; filarias lanceoladas a ovado-lanceoladas, ásperas en el envés, raramente algo hirsutas a casi glabras, cortamente ciliadas o glabras en los márgenes, 2 a 5 mm de ancho; cúspides medias de las páleas excediendo ligeramente las flores del disco, las flores del centro del capítulo

densamente ciliadas con pelos blancos o hirsutas en el ápice; flores del disco rojizas a púrpura, muy raramente amarillas; cipselas ligeramente hirsutas, 4 a 5,5 mm de largo; papus con dos finas aristas (Fig. 1.2).

Distribución geográfica

Helianthus annuus

Córdoba (C): Se localizaron poblaciones silvestres importantes por su extensión y desarrollo de las plantas en las proximidades de Alejandro Roca, La Carlota y Huanchilla (departamento Juárez Celman) y en los alrededores de la ciudad de Río Cuarto y Sampacho (departamento Río Cuarto). Asimismo se hallaron grupos pequeños o plantas aisladas en los departamentos Unión, Presidente Roque Sáenz Peña y General Roca, a lo largo de las rutas provinciales 4 y 24 y en caminos vecinales cercanos a las localidades de Melo, Pincén e Hilario Lagos.

La Pampa (LP): La población más extensa se encontró en proximidades de Colonia Barón, en el departamento Quemú Quemú. En Colonia Inés y Carlota y en los departamentos Rancul y Realicó se encontraron plantas aisladas y pequeños grupos. En banquinas y lotes sin cultivar se hallaron frecuentemente plantas sub-espontáneas de *H. annuus* o descendientes de ellas, que se diferencian fácilmente del tipo silvestre.

Buenos Aires (BA): La población más extensa del tipo silvestre se localizó en el partido de Adolfo Alsina, hacia el sur de la ruta provincial 60 hasta cercanías de Colonia San Miguel, apareciendo grupos esporádicos hasta la localidad de Puán. Se observaron plantas silvestres aisladas en banquinas y potreros de los partidos de Guaminí, Salliqueló, Trenque Lauquen y Rivadavia

Mendoza (M): Grupos numerosos, aunque no tan extensos como los anteriores, se hallaron en la localidad de Las Malvinas. En las banquinas de la ruta provincial 179, al sur de Las Malvinas y de la ruta nacional 40, al norte de la ciudad de Mendoza (departamento Las Heras) se observaron plantas aisladas o pequeños grupos. En esta provincia es frecuente encontrar plantas de *H. annuus* creciendo como ornamentales en jardines y lotes suburbanos, con características muy variables, que se asemejan al girasol cultivado.

San Juan (SJ): Una población grande se encontró al sur, en la localidad de Media Agua, departamento Sarmiento y una pequeña se halló en una quinta abandonada sobre la ruta nacional 20, en el departamento Caucete. También se

observaron plantas aisladas en banquinas y viñedos sobre la ruta 40, departamento Albardón. En esta provincia, como en Mendoza, se suelen observar formas ornamentales o similares, de morfología muy variable, en localizaciones suburbanas y dentro de los viñedos.

Entre Ríos (ER): En la localidad de Diamante se encontró una población extensa en las barrancas del río y grupos menores de plantas en localizaciones suburbanas. Esa población no mostraba caracteres de girasol cultivado, su fenotipo correspondía al tipo silvestre.

San Luis (SL): Se encontraron grupos pequeños y plantas aisladas al sur del departamento Gobernador Dupuy, en cercanías de la ruta nacional 188 y en el departamento Pringles, en las banquinas de la ruta nacional 7.

Los puntos extremos donde se halló la especie fueron: 31°20'S 68°32'O sobre la ruta 40 (SJ), 37°36'S en el partido de A. Alsina (BA) y 60°38'O en Diamante (ER). El tipo silvestre de *H. annuus* florece entre los meses de enero y marzo; en abril las plantas se encuentran en su mayoría senescentes. Las poblaciones relevadas eran compactas, formadas por individuos de tamaño similar. Ocasionalmente se halló una segunda cohorte de plantas jóvenes a fines del verano, situación que fue observada en los alrededores de Puán (BA) y en Diamante (ER). Las plantas de tipo silvestre fueron más tardías y de ciclo más largo que las plantas espontáneas de tipo cultivado. Las poblaciones se encontraron sobre distintos tipos de suelo, generalmente franco-arenosos pero también más pesados y húmedos (Fig. 1.3).

Helianthus petiolaris

La Pampa: Se encontraron poblaciones muy extensas en los departamentos Catrilo, Atreucó, Capital, Toay, Utracán, Quemú Quemú y Caleu Caleu. Poblaciones de menor desarrollo se encontraron en Conhelo, Hucal, Chapaleufú, Realicó, Loventué y Rancul. Las plantas crecían sobre caminos vecinales y banquinas, ocasionalmente invadiendo lotes sin cultivar y a la vera de lotes de girasol y otros cultivos. Se observaron con frecuencia plantas en los primeros metros dentro de los lotes de los cultivos y ocasionalmente, cubriendo importantes superficies.

Buenos Aires: Las poblaciones más densas y con plantas de mayor tamaño se localizaron en los partidos de Salliqueló, Puán, Tres Lomas y Trenque Lauquen, en las banquinas y caminos vecinales. Se encontraron poblaciones de menor desarrollo en Guaminí, Adolfo Alsina, Rivadavia, Pellegrini y Carlos Tejedor. En el partido de Bahía

Blanca, aparecieron plantas aisladas en las banquetas de las rutas de acceso por el oeste y hacia el puerto, por primera vez en 2002.

San Luis: Las mayores poblaciones se hallaron en los departamentos General Pedernera y Gobernador Dupuy, a lo largo de la ruta nacional 148 y en los caminos vecinales, en los alrededores de las localidades de Arizona y Unión. Se localizaron plantas aisladas y grupos pequeños en los departamentos Ayacucho y La Capital.

Córdoba: Se encontraron poblaciones de escaso desarrollo y plantas aisladas en los departamentos Río Cuarto, Presidente Roque Sáenz Peña y General Roca, haciéndose más frecuentes hacia el sur.

Helianthus petiolaris es mucho más frecuente y abundante que *H. annuus* silvestre, formando poblaciones compactas, aunque discontinuas, extendidas por kilómetros. Los puntos extremos donde fue encontrado son 33°14'S en cercanías de La Toma y 66°13'O en el dto. Capital (SL), 38°48'S en Bahía Blanca y 62°24'O en Guaminí (BA). El período de vegetación fue más amplio que para *H. annuus*, encontrándose plantas en plena floración a principios de enero y hasta fines de abril. Frecuentemente se observaron plantas de gran tamaño o senescentes y una segunda cohorte de plantas jóvenes comenzando la floración. Esta especie se encontró siempre en suelos arenosos, sueltos, soportando situaciones de mayor sequía que *H. annuus* (Fig. 1.3).

Ambas especies son simpátricas en los partidos de Guaminí, Adolfo Alsina, Salliqueló, Trenque Lauquen y Rivadavia (BA), en los departamentos Quemú Quemú, Rancul y Realicó (LP), Presidente Roque Sáenz Peña, General Roca (C) y Gobernador Dupuy (SL) pero sólo ocasionalmente se encontraron poblaciones mixtas. Estudios recientes realizados por mi grupo de trabajo permitieron identificar tres zonas híbridas donde conviven ambas especies: Carhué (BA), Colonia Barón y Winifreda (LP) (Cantamutto *et al.* 2007). Asimismo, las dos especies silvestres conviven con el girasol cultivado. En el área donde cohabitan se observaron con cierta frecuencia plantas con características morfológicas intermedias, que fueron herborizadas y se tomaron muestras de semilla a fin de comprobar si se trataba de especímenes híbridos. Se observó el mismo tipo de insectos polinizadores, tanto en los lotes de cultivo como en las poblaciones silvestres, himenópteros, especialmente abejas (*Apis mellifera*) y lepidópteros, principalmente *Colias lesbia*. Plantas de morfología intermedia entre *H. annuus* cultivado y silvestre se observaron frecuentemente dentro de los lotes de girasol o próximos a ellos, en los departamentos Juárez Celman (C),

San Rafael (M) y Albardón (SJ) y ocasionalmente en Trenque Lauquen y Adolfo Alsina (BA).

Discusión

La introducción de las especies, *H. annuus* silvestre y *H. petiolaris*, es incierta. El girasol silvestre fue por primera vez citado como maleza de cereales y cultivos oleaginosos en 2003 (Ciencia y Técnica Agropecuaria 2003). En su centro de origen en América del Norte ocasiona serios inconvenientes al desarrollo del cultivo de girasol y otros cultivos de verano (Heiser 1976). Zuloaga y Morrone (1999) consideran a ambas especies como naturalizadas en las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Entre Ríos; nuestros viajes de colección permitieron observar la real dimensión de su distribución y cómo año a año las poblaciones crecen en tamaño y ganan territorio, expandiéndose en la región de mayor producción agrícola de nuestro país.

En cuanto a morfología y descripción de ambas especies, las poblaciones de *H. petiolaris* responden a las características descritas en su centro de origen (Heiser 1961). Lo mismo ocurre con *H. annuus*, que a diferencia de lo propuesto por Cabrera (1974) no sólo fue encontrada como adventicia o voluntaria, sino también formando extensas poblaciones. En particular, *H. annuus* posee una mayor plasticidad que *H. petiolaris*, teniendo en cuenta el tipo de suelo en el que se desarrolla (Cantamutto *et al.* 2008). Por este motivo se puede observar una distribución menos compacta en la superficie que ocupa (Fig. 1.3). Se desarrolla tanto en suelos fértiles y pesados como los del sur de Córdoba, Mendoza y Entre Ríos, como en suelos arenosos de La Pampa y oeste de Buenos Aires. Esto la señala como una especie con la capacidad de subsistir y desarrollarse bajo diversos regímenes de lluvias y distintos ambientes. No ocurre lo mismo con *H. petiolaris*, que crece más frecuentemente en suelos más livianos y arenosos (Cantamutto *et al.* 2008); el mayor número de poblaciones correspondientes a esta especie se encuentra en la provincia de La Pampa (Fig. 1.3). Las especies también se diferencian en cuanto a su distribución. *H. petiolaris* suele formar extensas poblaciones a lo largo de caminos manteniendo una continuidad. *H. annuus* generalmente forma poblaciones delimitadas, aunque ambas tienen una distribución en parches normalmente asociada a ambientes disturbados (Poverene *et al.* 2008).

A pesar de la diferencia en cuanto a distribución y asentamiento, las dos especies silvestres frecuentemente se encuentran creciendo en la misma localidad; este tipo de eventos también es común en su centro de origen (Heiser 1961). Ambas son simpátricas en varios partidos del oeste de Buenos Aires, en el departamento Quemú Quemú (LP) y en el sudeste de Córdoba, donde la presencia frecuente de individuos fuera de tipo sugiere hibridación e introgresión entre ellas. Entre Catrillo y General Pico (LP) Covas y Vargas López (1970) encontraron plantas con características intermedias entre *H. petiolaris* y *H. annuus*, que corresponderían a híbridos naturales entre ambas o retrocruzas con las especies parentales. Las plantas de *H. annuus* involucradas en estas cruas serían de girasol cultivado o sus descendientes. Los híbridos pueden ser identificados mediante caracteres morfológicos intermedios, criterios citogenéticos (Ferreira 1980, 1985) y marcadores isoenzimáticos (Carrera y Poverene 1995). El presente relevamiento indica que *H. petiolaris* hibridaría tanto con *H. annuus* cultivado como silvestre, ya que los fenotipos intermedios se hallaron en áreas donde ambas especies silvestres son simpátricas y en regiones de cultivo de girasol donde solamente se registró la presencia de *H. petiolaris*.

Helianthus annuus, el predecesor silvestre del girasol cultivado, es la especie más diversa del género en cuanto a caracteres morfológicos, probablemente como resultado de la frecuente hibridación con el girasol cultivado (Heiser 1954; Seiler y Rieseberg 1997). Heiser (1954) reconoce tres subespecies, *H. annuus* spp. *lenticularis*, spp. *texanus* y spp. *annuus*, además de *H. annuus* var. *macrocarpus*, el girasol cultivado. Las dimensiones del disco, filarias y cipselas indicarían que las poblaciones argentinas corresponden a *H. annuus* ssp. *annuus*, en adelante *H. a. annuus*. Por ser una especie alógama autoincompatible, dentro de las poblaciones se encuentra gran variabilidad para muchos caracteres como ramificación, color de las lígulas y cipselas y presencia de antocianinas en el tallo (Presotto *et al.* 2009). No obstante, este tipo se diferencia fácilmente del tipo cultivado en las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba y Entre Ríos. Las plantas que crecen en localidades suburbanas y viñedos en Mendoza y San Juan muestran una variación de fenotipos morfológicos con combinación de características de cultivado y silvestre, probablemente como resultado de cruzamientos y selección, así como a efectos fundadores, debido a que son perpetuadas con fines ornamentales. Las poblaciones que pueden considerarse naturalizadas son las que se han establecido sobre extensiones considerables y se mantienen sin influencia antrópica, como las de

Huanchilla y Río Cuarto (C), Colonia Barón (LP) o Adolfo Alsina (BA). La presencia de caracteres del tipo cultivado puede ser explicada por la proximidad de lotes de girasol y la ocurrencia de cruzamientos naturales. Las plantas sub-espontáneas que aparecen en banquinas y potreros en las regiones de cultivo de girasol y las que se observan en localidades suburbanas, no pueden considerarse, a primera vista, naturalizadas. En algunos casos es difícil establecer esa diferencia, como en el caso de las localidades de Las Malvinas (M) y La Carlota (C) y probablemente sean necesarios estudios de marcadores moleculares para demostrar la estabilidad de la estructura genética de esas poblaciones. La selección con fines de mejoramiento genético en el girasol ha fijado numerosos marcadores que aún permanecen polimórficos en las poblaciones silvestres (Carrera y Poverene 1995; Rieseberg *et al.* 1999c)

Helianthus petiolaris se conoce como girasol silvestre, girasolcito o girasolcito del campo (Troiani y Steibel 1999). Covas (1966) la describió por primera vez, datando su introducción en la década de 1950. Rápidamente se naturalizó en las provincias de La Pampa y Buenos Aires, avanzando en dirección este-oeste, desde el departamento Catrilo (Covas 1984) así como hacia el norte, hasta el sur de Córdoba y San Luis (Ferreira 1980). Actualmente se encuentra muy difundida por la provincia de San Luis y el oeste de Buenos Aires y continúa su expansión, como surge de comparar nuestras observaciones con las de González Roelants *et al.* (1997). Las poblaciones corresponderían a *H. petiolaris* ssp. *petiolaris* de acuerdo a Heiser (1961).

El área sembrada de girasol se ha modificado en los últimos años, mediante un desplazamiento hacia el sud-oeste, debido al avance de la soja (de la Vega 2007). Este panorama muestra la necesidad de generar nuevos materiales en el mercado de girasol con la capacidad de adaptarse a zonas menos productivas. Para ello pueden ser de gran utilidad las especies silvestres que ya se encuentran naturalizadas y adaptadas a las distintas regiones de nuestro país. A su vez, el desplazamiento del cultivo lo lleva a compartir las regiones donde prosperan ambas especies silvestres. En base a datos del Panorama Agrícola de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires (www.bolcereales.com.ar) se estima que actualmente el girasol silvestre se encuentra en el 50% de la superficie cultivada, en comparación con el 15% estimado por González Roelants *et al.* (1997). Por tal motivo, teniendo en cuenta los materiales con nuevas características que puedan liberarse al mercado, debería prestarse especial atención a la posibilidad de cruzamientos entre especies, por las características que el cultivo pudiera transferir a las poblaciones silvestres lindantes.

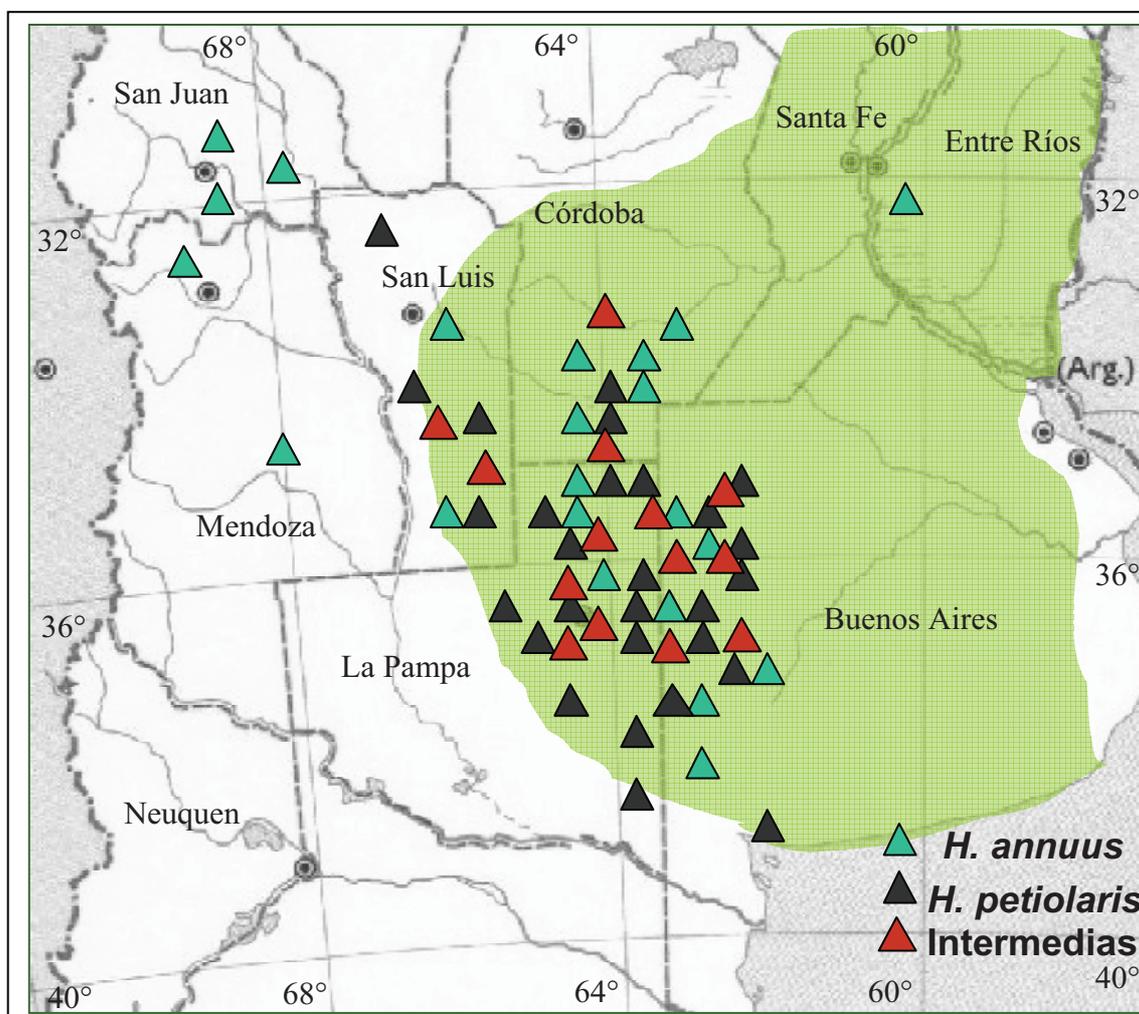
Figura. 1.1. Población de *Helianthus annuus* spp. *annuus* a) en Diamante, Entre Ríos
b) en Las Malvinas, Mendoza.



Figura. 1.2. Población de *Helianthus petiolaris* en a) Atreucó, La Pampa b) Saliqueló, Buenos Aires.



Figura 1.3. Mapa de distribución geográfica de especies silvestres de *Helianthus* en Argentina, *H. annuus* spp. *annuus* y *H. petiolaris*. Cada símbolo representa un departamento provincial donde existen poblaciones estables. El área sombreada corresponde a la región de cultivo de girasol.



Capítulo II

Variabilidad genética en poblaciones de *Helianthus annuus*

Desde su introducción en el país (Bauer 1991; Bertero y Vazquez 2003) las especies silvestres de girasol, *Helianthus petiolaris* y *H. annuus* probablemente se expandieron a partir de un número reducido de individuos. Sin embargo, dado lo incierto del proceso, pueden haber ocurrido sucesivos eventos de introducción que dieron origen a diferentes núcleos poblacionales. Estas hipótesis alternativas acerca del proceso de naturalización conducirían a distintas estructuras genéticas en relación a la variabilidad de las poblaciones. La estimación de la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones puede contribuir al conocimiento de dicha estructura (Perfectti y Pascual 2004; Afif *et al.* 2006; De Woody *et al.* 2009).

La distribución de la variación genética en poblaciones naturales está principalmente determinada por el número de individuos, el modo reproductivo (autogamia, alogamia), el tipo de polinización (gravedad, anemófila, entomófila), las distancias inter-demos, la acción del hombre en la fragmentación del hábitat y el origen histórico (especies nativas o introducidas) (Hamrick 1982).

Tanto las isoenzimas como los microsatélites (SSR) de ADN resultan adecuados para analizar poblaciones, por su modo de herencia de tipo codominante (Torres *et al.* 2003; Morikawa y Leggett 2008; Sujatha *et al.* 2008). Los marcadores isoenzimáticos tuvieron un rol prominente en estudios de poblaciones vegetales para determinar variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva así como en la descripción de germoplasma e identificación de variedades (Soltis y Soltis 1989). Las isoenzimas han sido ampliamente utilizadas en girasol para el mapeo genético (Kahler y Lay 1985; Quillet *et al.* 1995; Carrera *et al.* 2002), el estudio de diversidad en genotipos domesticados y silvestres (Dry y Burdon 1986; Rieseberg *et al.* 1991; Quillet *et al.* 1992; Cronn *et al.* 1997) y la caracterización de híbridos interespecíficos. Estos marcadores permitieron describir la gran diversidad eco-geográfica del girasol y esclarecieron la relación entre el girasol domesticado y sus ancestros silvestres (Rieseberg y Seiler 1990; Cronn *et al.* 1997).

El estudio de variabilidad genética de las poblaciones naturales de *H. annuus* permite obtener información sobre del proceso de introducción, la estructura de las

poblaciones y la presencia de marcadores característicos de materiales silvestres y cultivados, como un paso previo a la estimación del flujo génico entre los mismos. Con este fin, se recolectaron muestras de poblaciones silvestres creciendo en la vecindad de lotes cultivados, consideradas simpátricas con el girasol domesticado, como así también poblaciones alopátricas, suficientemente alejadas de las regiones de cultivo como para suponer que no habían estado expuestas a flujo génico desde el girasol domesticado. En poblaciones silvestres simpátricas se esperaría encontrar alelos característicos de líneas o híbridos de girasol que provengan de introgresión de genes de girasol cultivado en la especie silvestre, mientras que en poblaciones alopátricas esos alelos estarían ausentes.

El objetivo principal de esta sección fue estudiar la variabilidad genética de las poblaciones naturalizadas de girasol. Los objetivos particulares fueron: 1) Conocer los componentes de la diversidad de genotipos entre y dentro de las poblaciones; 2) Obtener información acerca del proceso de introducción y dispersión de *H. annuus* en la Argentina; 3) Comparar la variabilidad genética entre materiales silvestres y cultivados; 4) Identificar marcadores útiles para estudiar el flujo génico desde el cultivo a las poblaciones silvestres.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se analizaron 20 poblaciones de *H. a. annuus*, la línea HA89 y cuatro híbridos comerciales (DK 3900, 3915, 4033 y 3881) mediante marcadores isoenzimáticos. Se tomaron 40 individuos al azar de cada una de las poblaciones de *H. a. annuus*. Las mismas pertenecían a distintas localidades de nuestro país, cubriendo el área de distribución de la especie (Tabla 2.1). Se utilizaron también marcadores microsatélites para un estudio de la composición alélica de poblaciones simpátricas y alopátricas con el girasol cultivado. Para este fin, se analizaron 20 individuos de cada una de dos poblaciones lindantes a lotes de girasol cultivado (de Juárez Celman y Carhué), dos aisladas del cultivo al momento de recolección (de Río Cuarto y C12 Juarez Celman, de la Tabla 2.1) y seis líneas endocriadas de girasol, HAR2, RHA 274, HAR 5, HAR 3, HA 369 y HA89. Estas líneas fueron provistas por investigadores de EEA INTA Balcarce y elegidas para monitorear los marcadores moleculares característicos de

girasol cultivado (Pizarro *et al.* 2000), por haber sido ampliamente utilizadas en los programas de mejoramiento genético en el país.

Tabla 2.1. Poblaciones de *H. a. annuus* analizadas mediante marcadores moleculares

Provincia	Depto o Partido	Identificación
Córdoba	Juárez Celman	C1 a C4/ C10 a C12
Córdoba	Río Cuarto	C5 a C9
La Pampa	Quemú Quemú	LP13
Mendoza	San Rafael	M14 a M15
Entre Ríos	Diamante	ER16
Buenos Aires	Trenque Lauquen	BA17 a BA18
San Juan	Albardón	SJ19
San Luis	Gobernador Dupuy	SL20

Isoenzimas

Se estudiaron cinco sistemas isoenzimáticos: alcohol dehidrogenasa (ADH), glutamato dehidrogenasa (GDH), fosfoglucoisomerasa (PGI), esterasa (EST) y fosfatasa ácida (ACP). Los extractos se obtuvieron a partir de semilla remojada por 12 horas. El tejido se homogeneizó en mortero utilizando buffer Tris-ClH-mercaptoetanol 0,1M pH 7. El extracto fue absorbido en trozos de papel Whatman n°3 de 4 x 7mm. Los geles se prepararon con almidón hidrolizado de papa (SIGMA) al 10 %. El sistema utilizado fue buffer Tris 15 mM/ácido cítrico 4 mM pH 7,8 para el gel y NaOH 0,1M/ácido bórico 0,3M pH 8,6 para los electrodos (Soltis *et al.* 1983). La siembra se realizó sobre ranuras practicadas en el gel, a 4 cm del cátodo. La electroforesis se condujo a intensidad constante de 25 mA por gel a 4°C. En todas las corridas se incluyeron la línea HA89 y los cuatro híbridos comerciales cuyos zimogramas ya habían sido caracterizados (Carrera 2001). Las variantes alélicas se notaron con letras en orden decreciente de velocidad de migración. Para el revelado, el gel fue cortado en forma horizontal, obteniéndose hasta cuatro capas de aproximadamente 2 mm de espesor. Generalmente la primera capa fue desechada por presentar señal difusa de actividad. Cada capa fue transferida a una caja con solución específica de revelado (Tabla 2.2). La incubación se realizó en baño térmico a 35°C en oscuridad hasta que las bandas presentaron una definición óptima.

Tabla 2.2. Soluciones de revelado para cinco sistemas isoenzimáticos. Cantidades requeridas para 100 ml.

Enzima	Solución de revelado
ACP	Acetato de Na 0.1M pH 5, 20mg α -naftil fosfato ácido, 5 mg Fast Garnet GBC.
ADH	Tris-ClH 0.1M pH 8, 0.5 ml etanol, 10 mg NBT, 10 mg NAD, 2 mg PMS.
EST	Fosfato de Na 0.1M pH 6, 5 mg α -naftil acetato, 5 mg Fast Garnet.
GDH	Tris-ClH 0.1M pH 8, 800mg ác. glutámico, 10 mg NAD, 10 mg NBT, 2 mg PMS.
PGI	Tris-ClH 0.1M pH 8, 20mg fructuosa-6-fosfato, 10 mg NADP, 10 mg NBT, 2mg PMS.

Microsatélites (SSR)

Se tomaron hojas jóvenes de las cuatro poblaciones y las seis líneas evaluadas. El tejido fue liofilizado y se realizó una extracción y cuantificación de DNA mediante el método de CTAB (Futterer *et al.* 1995). El material vegetal se colocó en tubos Eppendorf de polipropileno de 15 ml. Los tubos fueron mantenidos en hielo durante la recolección de material y se colocaron a -70° C durante 2 horas. Luego se liofilizaron durante 48 horas. Cada muestra se maceró en un mortero, hasta obtener polvo fino y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2,2 ml. Se agregaron 800 μ l de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 8, 700 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% p/v CTAB, 1% p/v β -mercaptoetanol) en cada muestra y se mezcló suavemente hasta lograr la completa hidratación del material vegetal macerado. Los tubos se incubaron en baño de agua a 56° C durante 15 min y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Se agregaron 800 μ l de cloroformo-octanol (24:1) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. A la fase acuosa se agregaron 80 μ l de CTAB y 800 μ l de cloroformo-octanol (24:1) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa superior se transfirió a otro tubo y se agregaron 1000 μ l de buffer de precipitación (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1% p/v CTAB). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 400 μ l de cloruro de sodio. Se agregaron 1000 μ l de etanol puro y se incubaron las muestras a -70° C durante 30 min, centrifugando a 14.000 rpm durante

10 min. Se repitió el lavado y se dejó secar el pellet, que se disolvió en 50 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH8, EDTA 1 mM). Se tomó una alícuota para evaluar la calidad y concentración del ADN purificado y las muestras se almacenaron a -20°C .

Para estimar la pureza de las muestras se midió absorbancia a 280 nm y a 260 nm y se calculó la relación A_{260}/A_{280} . Con esa relación se calculó la concentración de ADN de la muestra, empleando la siguiente expresión: $[\text{ADN}] = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 \text{ Ng/ } \mu\text{l}$. Preparaciones puras de ADN tienen una relación de 1,8 – 2,0. Valores menores indican contaminación con proteínas mientras que valores mayores se deben a contaminación con sales o con cloroformo-fenol.

La técnica de microsatélites consiste en la amplificación de secuencias repetitivas (SSR) de ADN genómico. Se utilizaron tres iniciadores (“primers”) SSR (Tabla 2.3, <http://www.sunflower.uga.edu/cgi-bin/cmap/viewer>) para la amplificación de 30 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 μ l. Se estableció la temperatura de hibridación (TA) para cada “primer”. Se utilizó el protocolo del laboratorio detallado en Burke *et al.* 2002b, adaptado en nuestro laboratorio. En un volumen final de reacción de 25 μ l se colocaron: buffer PCR Gibco 10X; Cl_2Mg (2,5 mM), dNTP (0,125M cada uno), primers F y R (5,5 pmol cada uno), 0,8 unidades de Taq polimerasa y 30 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 3 minutos, seguida de un ciclo compuesto por 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 - 5°C) 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 denaturalizante de poliacrilamida al 6%. Se sembraron 8 μ l del producto de cada amplificación y se corrió a 85 W durante 3 horas en una cuba de secuenciación Sequi-Gen GT Bio Rad. Se incluyó un marcador de peso molecular 30-330bp Step ladder (Promega). Las bandas SSR fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata (Silver Staining kit, Promega) y fotografiadas. La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que cada banda representaba un locus simple codominante

Tabla 2.3. Secuencias de los “primers” utilizados para evaluación de poblaciones de girasol.

“Primer”	Secuencias
ORS-297	F TGCAAAGCTCACACTAACCTG
	R GTGTCTGCACGAACTGTGGT
ORS-399	F CGTACGGTGTAGTTCTCATGGT
	R GGATCACGTGGCGTTCTATT
ORS-643	F CATCAAGGCAAGTAGCATCA
	R CCTCATCCGAAACCCATTAG

Análisis de los datos

Isoenzimas

A partir de los zimogramas se construyó una matriz de frecuencias genotípicas. Utilizando los programas Biosys (Swofford y Selander 1981), POPGENE (www.ualberta.ca/~fyeh/) y GenAlEx 6 (Peakall y Smouse 2006) se obtuvieron los siguientes parámetros de diversidad: P: número de loci polimórficos, A: número promedio de alelos por locus, H: heterocigosis esperada promedio ($1 - \sum x_i^2$, donde x es la frecuencia del alelo i). Para evaluar las desviaciones respecto del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó una prueba de Chi-cuadrado. Se calculó el coeficiente de endogamia $F_{IS} = H_e - H_o / H_e$ (Wright 1978), cuya significación fue probada mediante una prueba Chi-cuadrado con k (k-1)/2 grados de libertad según la expresión $X^2 = F_{IS}^2 N (k-1)$, siendo k el número de alelos (Workman y Niswander 1970).

La heterogeneidad en las frecuencias alélicas entre poblaciones fue evaluada a través de un análisis Chi-cuadrado de contingencia. La distribución de la variabilidad entre y dentro de las poblaciones fue estudiada mediante los índices H_T , H_S y G_{ST} (Nei 1973) donde H_T ($H_T = H_S + D_{ST}$) es la diversidad genética total, H_S es la diversidad existente dentro de cada población y D_{ST} es la existente entre las poblaciones. El coeficiente G_{ST} ($G_{ST} = D_{ST} / H_T$) es la diferenciación genética relativa entre las poblaciones. Las relaciones entre las poblaciones se analizaron mediante la distancia genética de Rogers y análisis de agrupamiento siguiendo el método UPGMA. Las

matrices de distancia genética y geográfica fueron comparadas mediante el test de correspondencia de Mantel con el programa InfoStat (2006).

Microsatélites

A partir de las frecuencias alélicas de los tres loci SSR se realizaron pruebas de equilibrio y se obtuvieron las medidas de diversidad con POPGENE. Se realizó además un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992, Peakall *et al.* 1995). La variación genética total fue partida en tres niveles: entre regiones, entre poblaciones y entre individuos dentro las poblaciones. La significación estadística se obtuvo mediante 1000 permutaciones al azar. El análisis de esos datos se realizó mediante el programa GenAlEx 6.

Resultados

Medidas de Diversidad

Los zimogramas presentaron buena resolución en los materiales cultivados y silvestres (Fig. 2.1), excepto para la enzima Acp que solamente presentó buena resolución en las 12 poblaciones de Córdoba y una de Buenos Aires. La Tabla 2.4 muestra los parámetros de diversidad obtenidos en 20 poblaciones de *H. annuus* silvestre. Los loci evaluados fueron polimórficos para todas las poblaciones, excepto el locus Pgi-1.

Los valores promedio para las 12 poblaciones de Córdoba fueron $A=1,64$, $P_{0,01}= 45,82$, $P_{0,05}= 40,26$ y $H= 0,16$. En la provincia de Mendoza el promedio fue $A= 1,33$, $P_{0,01}= 25,00$, $P_{0,05}=16,67$ y $H=0,09$, mientras que en Buenos Aires se obtuvieron los valores promedio $A= 1,84$, $P_{0,01}=58,33$, $P_{0,05}=58,33$ y $H=0,23$

En promedio, 37,5% de los loci fueron polimórficos, con valores individuales de P en las poblaciones entre 0 y 66,7%. La mayor parte de los valores de P resultaron similares utilizando 0,01 ó 0,05 como criterio de polimorfismo, excepto para la población de San Juan. El número de alelos en los seis loci analizados en todas las poblaciones varió entre $A=1,3$ y 2 con un promedio de 1,6. Se encontró un alelo por

locus más frecuente característico de cada una de las poblaciones, a excepción de los loci *Adh-1*, *Gdh-2* y *Pgi-2* en las que el mismo alelo fue el más común en todas las poblaciones. Según la clasificación de Brown (1978) se encontraron dos alelos “comunes localizados” en Córdoba (*Adh1-c*, *Pgi2a*), uno en Buenos Aires (*Adh1a*) y uno compartido por Mendoza, San Luis, San Juan, Entre Ríos y Buenos Aires (*Gdh2a*). La Tabla 2.5 muestra en forma comparativa las medidas de variabilidad de poblaciones de *H. annuus* en su centro de origen, en Argentina y en materiales cultivados.

Tabla 2.4. Medidas de diversidad isoenzimática de 20 poblaciones de *Helianthus annuus*. $P_{0,05}$ y $P_{0,01}$: porcentaje de loci polimórficos utilizando frecuencias de 0,05 y 0,01 como criterios de polimorfismo.

Población	A	$P_{0,01}$	$P_{0,05}$	H
C1	1,5	33,30	33,30	0,148
C2	1,8	50,00	50,00	0,165
C3	1,7	66,67	66,67	0,178
C4	1,7	50,00	33,30	0,116
C5	1,5	33,30	33,30	0,144
C6	1,5	33,30	33,30	0,14
C7	1,7	50,00	50,00	0,225
C8	2,0	66,67	50,00	0,201
C9	2,0	66,67	33,30	0,197
C10	1,5	33,30	33,30	0,142
C11	1,5	33,30	33,30	0,133
C12	1,3	33,30	33,30	0,131
LP13	1,33	33,33	33,33	0,106
M14	1,33	16,67	16,67	0,108
M15	1,33	33,33	16,67	0,084
ER16	1,5	33,33	33,33	0,128
BA17	2	66,67	66,67	0,295
BA18	1,67	50,00	50,00	0,165
SJ19	1,33	33,33	0,00	0,018
SL20	1,67	50,00	50,00	0,165
Promedio	1,6	43,32	37,49	0,17

Figura 2.1. Zimogramas de *Helianthus annuus annuus* y tres genotipos cultivados (1: 3915; 2: HA89; 3: 3900) a) Esterasa (Est-1) y Fosfatasa Acida (Acp-1). b) Alcohol Dehidrogenasa (Adh-1, Adh-2) y Glutamato dehidrogenasa (Gdh-2).

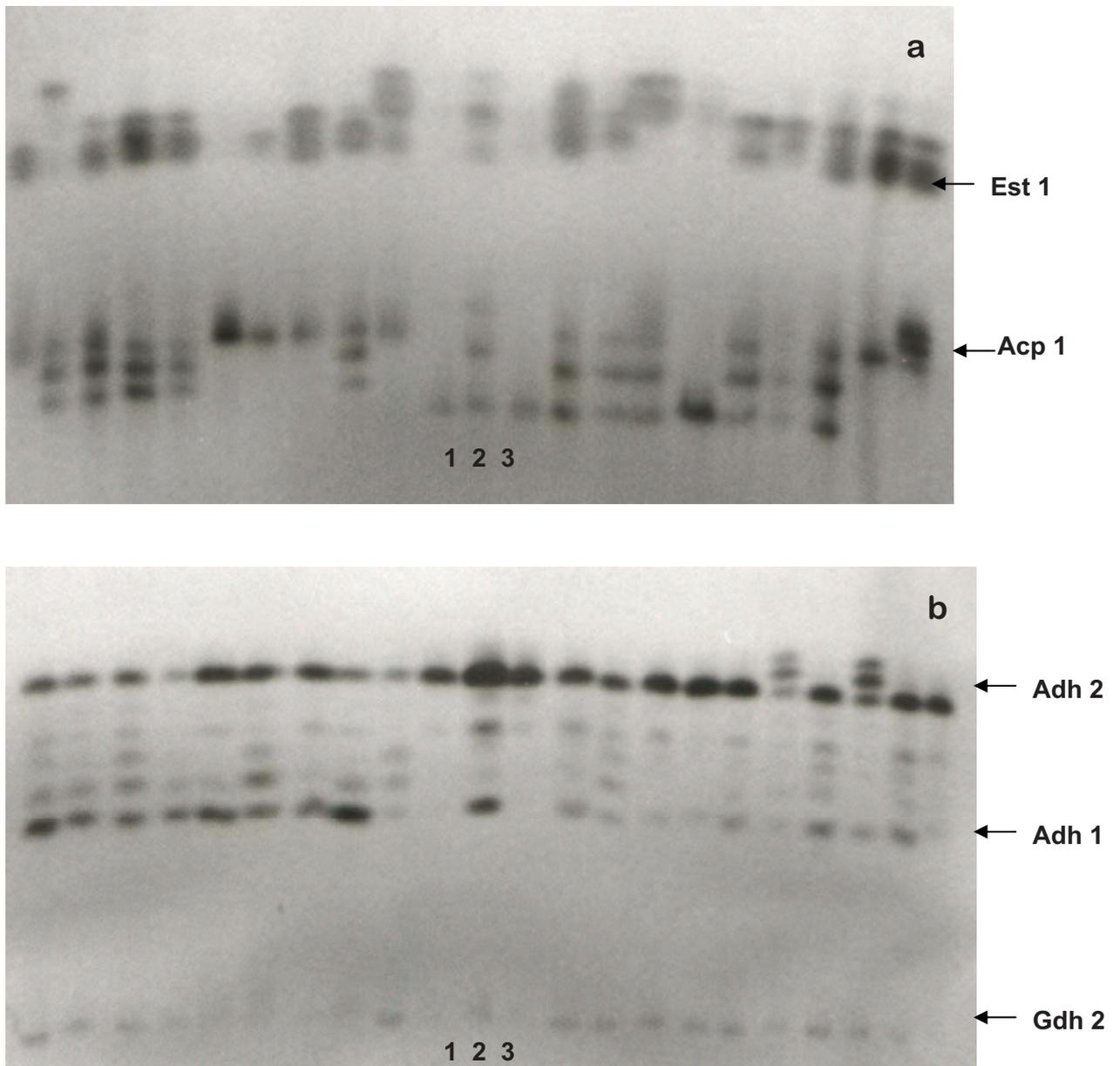


Tabla 2.5. Medidas de diversidad isoenzimática de *Helianthus annuus* silvestre en Argentina comparados con valores del centro de origen y de materiales cultivados

Materiales	P	A	H
H, <i>annuus</i> silvestre EUA ¹	0,56	1,65	0,21
H, <i>annuus</i> silvestre Argentina	0,43	1,60	0,17
Líneas endocriadas y híbridos comerciales ²	0,42	1,47	0,15

¹ Cronn *et al.* 1997

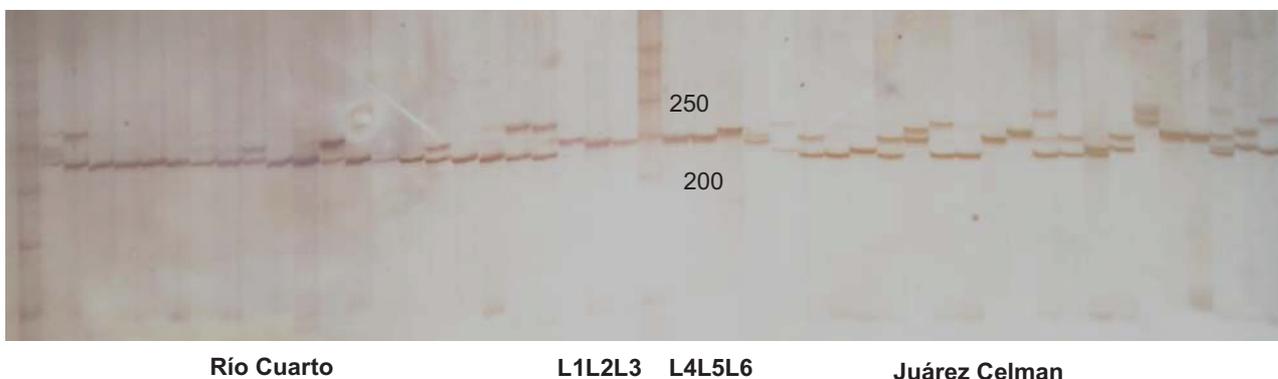
² Carrera *et al.* 2002

El número total de alelos para los tres marcadores microsatélites fue de 3, 6 y 7 para los “primers” ORS-643, ORS-399 Y ORS-297, respectivamente (Tabla 2.6) y el tamaño de los fragmentos amplificados varió entre 200 y 300 pb tanto para las poblaciones simpátricas como para las alopátricas (Fig. 2.2).

Tabla 2.6. Frecuencias alélicas por locus SSR en cuatro poblaciones silvestres y seis líneas endocriadas

Locus y alelos	Juarez Celman	Carhué	Río Cuarto	La Carlota	Líneas cultivadas
ORS-297					
A	0,075		0,350		
B	0,100		0,025	0,750	
C	0,150	0,350	0,050	0,050	0,333
D	0,300	0,250	0,300	0,050	0,667
E	0,100		0,075		
F	0,275	0,300	0,200	0,825	
G		0,100			
ORS-399					
A		0,313	0,026	0,2101	
B	0,200	0,125	0,290	0,053	1,000
C	0,300	0,406	0,237	0,421	
D	0,475	0,094	0,263	0,184	
E	0,025	0,063	0,184	0,105	
F				0,026	
ORS-643					
A	0,550	0,500	0,425	0,579	1,000
B	0,450	0,500	0,575	0,421	

Figura 2.2. Patrón de amplificación de microsatélites obtenido utilizando el “primer” ORS-297 para las poblaciones de Río Cuarto y Juárez Celman y seis líneas endocriadas (L1: HAR2, L2: RHA 274, L3: HAR 5, L4: HAR 3, L5: HA 369, L6: HA89).



El número promedio de alelos por locus y la heterocigosis media para cada una de cuatro poblaciones de girasol silvestre fue mayor que en el conjunto de seis líneas endocriadas representativas de girasol cultivado (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Número promedio de alelos y heterocigosis correspondiente a tres microsatélites en cuatro poblaciones de *H. annuus* silvestre y el conjunto de líneas endocriadas de girasol cultivado. (nA: número de alelos; H: heterocigosis media)

Material	Promedio	
	nA	H
Juarez Celman	4	0,64
Carhue	3,6	0,64
Río Cuarto	4,33	0,66
La Carlota	4	0,50
silvestres	5	0,67
Líneas endocriadas	1,33	0,15

Desviaciones del equilibrio de Hardy- Weinberg

Sobre un total de 66 pruebas de equilibrio en loci isoenzimáticos de 14 poblaciones, 36 mostraron desviaciones significativas (Tabla 2.8). El índice de fijación F_{IS} mostró una deficiencia de heterocigotos en la mayor parte de las poblaciones; 21 loci distribuidos en 13 poblaciones resultaron positivos y significativamente distintos de

ceros, con un valor promedio de F_{IS} de 0,30. La Tabla 2.9 muestra los valores obtenidos a partir de marcadores microsatélites.

Tabla 2.8. Frecuencia observada de heterocigotos (H_0), desviación del equilibrio y coeficiente de endogamia (F_{IS}) en 20 poblaciones de *Helianthus annuus* analizadas mediante isoenzimas.

Población	LOCUS	H_0	Valor χ^2	F_{IS}	
C1	Adh-2	0,447	0,427	-0,019	
	Est-1	0,342	6,25	0,149	
	Acp-1	0,364	10,005**	0,062	
C2	Adh-2	0,105	36,47**	0,2897*	
	Pgi-2	0,447	5,38	-0,024	
	Est-1	0,117	17,58**	0,697**	
	Acp-1	0,308	14,84**	0,131	
	C3	Adh-1	0,2	2,48	0,245
		Adh-2	0,105	0,08	-0,055
Pgi-2		0,447	2,94	-0,288	
Est-1		0,323	0,19	0,059	
	Acp-1	0,208	42,50**	0,213	
	C4	Adh-2	0,131	75,17**	0,2292
Pgi-2		0,026	0,0000	-0,0133	
Est-1		0,4	1,37	0,1833	
Acp-1		0,267	24,7**	0,169	
C5	Pgi-2	0,236	0,60	-0,134	
	Est-1	0,379	12,97**	0,409**	
	Acp-1	0,296	23,74**	0,131	
C6	Pgi-2	0,405	0,010	0,0027	
	Est-1	0,342	2,97	0,1892	
	Acp-1	0,315	28,22**	0,127	
C7	Adh-1	0,236	11,05**	0,526**	
	Pgi-2	0,184	2,91	0,255	
	Est-1	0,241	20,37**	0,583**	
	Acp-1	0,357	20,68**	0,096	
C8	Adh-1	0,0833	11,73**	0,525**	
	Adh-2	0,0789	0,042	-0,041	
	Pgi-2	0,4211	4,73	0,015	
	Est-1	0,4545	0,78	0,1073	
	Acp-1	0,156	65,36**	0,0621	
C9	Adh-1	0,0526	0,013	-0,027	
	Adh-2	0,0571	0,014	-0,029	
	Pgi-2	0,378	27,45**	0,11	
	Est-1	0,444	22,83**	0,3005**	
	Acp-1	0,367	11,65**	-0,024	

C10	Pgi-2	0,162	6,75**	0,403**
	Est-1	0,323	14,94**	0,427**
	Acp-1	0,321	52,058**	0,613**
C11	Pgi-2	0,258	3,04	0,122
	Est-1	0,137	15,94**	0,723**
	Acp-1	0,349	62,773**	0,306*
C12	Pgi-2	0,236	2,77	0,252
	Est-1	0,333	3,07	0,277
	Acp-1	0,222	28,203**	0,213
LP13	Pgi-2	0,184	0,70	0,117
	Est-1	0,405	0,16	0,053
M14	Est-1	0,555	3,63	0,128
M15	Gdh-2	0	75,01**	1**
	Est-1	0,388	0,70	0,125
ER16	Gdh-2	0,052	11,48**	0,472**
	Est-1	0,416	14,61**	0,365*
BA17	Adh-1	0,222	4,18*	0,446*
	Adh-2	0,157	11,71**	0,333
	Pgi-2	0,472	0,18	-0,086
	Est-1	0,315	12,24**	0,5180**
	Acp-1	0,377	29,973**	0,269
BA18	Gdh-2	0,052	11,48**	0,472**
	Pgi-2	0,210	0,34	0,078
	Est-1	0,475	7,83*	0,265**
SJ19	Gdh-2	0	71,01**	1**
	Est-1	0,055	0,01	-0,028
SL20	Adh-2	0,342	1,57	0,189
	Gdh-2	0	75,01**	1
	Pgi-2	0,405	1,38	0,179
	Est-1	0,290	22,8**	0,550**

(*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$

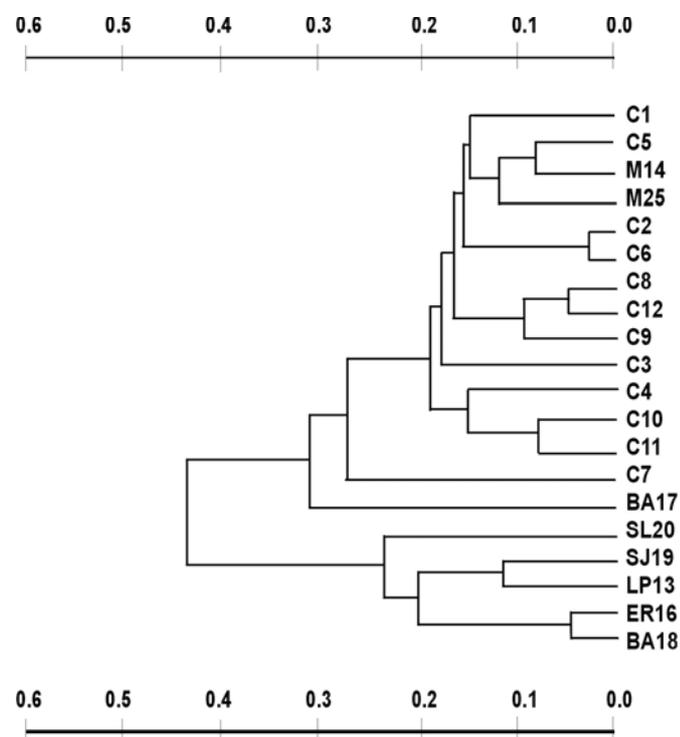
Tabla 2.9. Frecuencia observada de heterocigotos (H_o), desviación del equilibrio y coeficiente de endogamia (F_{IS}) en cuatro poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* evaluadas mediante marcadores microsatélites.

Población	ORS-297			ORS-399			ORS-643		
	H_o	χ^2	F_{IS}	H_o	χ^2	F_{IS}	H_o	χ^2	F_{IS}
Juarez Celman	0,78	NS	0,17	0,64	**	0,45	0,49	NS	-0,41
Río Cuarto	0,71	NS	0,052	0,70	NS	0,026	0,50	NS	-0,329
La Carlota	0,73	NS	-0,13	0,75	NS	0,06	0,48	**	-0,5
Carhue	0,30	**	0,3	0,72	**	0,38	0,48	NS	-0,5

Análisis de agrupamiento

La Figura 2.3 muestra el análisis de agrupamiento de las poblaciones basado en datos isoenzimáticos. En tanto, la comparación de matrices de distancia genética y geográfica evidenció una correlación de 0,37 altamente significativa.

Figura. 2.3. Análisis de agrupamiento de 20 poblaciones de *Helianthus annuus* basado en la distancia genética de Rogers sobre datos de frecuencias isoenzimáticas. Los códigos corresponden a las poblaciones de la Tabla 2.1.



El contraste global basado en marcadores microsatélites entre poblaciones simpátricas y alopátricas mostró diferencias altamente significativas ($P < 0,005$) en el número de individuos con alelos del cultivo (Tabla 2.10)

Tabla 2.10. Número de individuos que llevan alelos típicos del girasol cultivado en poblaciones de girasol silvestre en contacto (simpátricas) y aisladas (alopátricas) del mismo.

Poblaciones	ORS-297c	ORS-297d	ORS-399b	ORS-643a
Simpátricas	19	18	12	25
Alopátricas	3	14	17	30
$X^2=12,80$ $P<0,005$				

El estudio de varianza molecular mostró que la mayor parte de la variación se encontraba dentro de las poblaciones. El componente entre poblaciones también fue significativo y no se encontró variación asociada a la condición simpátrica vs alopátrica.

Distribución de la variabilidad

La Tabla 2.11 muestra la distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de *H. annuus* en Argentina. Estos resultados señalan que la diferenciación entre poblaciones es un importante componente de la diversidad genética total. Las pruebas de Chi-cuadrado de contingencia para heterogeneidad de frecuencias alélicas entre poblaciones fueron altamente significativas para todos los loci ($p < 0,001$).

Tabla 2.11. Distribución de la variabilidad genética en poblaciones silvestres de *Helianthus annuus*. H_T , H_S , D_{ST} , G_{ST} : estadísticos de Nei (1973).

Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
Adh-1	0,103	0,069	0,034	0,330
Adh-2	0,406	0,080	0,326	0,803
Gdh-2	0,016	0,015	0,001	0,050
Pgi-2	0,302	0,238	0,064	0,212
Est-1	0,635	0,509	0,126	0,198
Acp-1	0,917	0,434	0,034	0,596
Promedio	0,396	0,224	0,0975	0,364

Discusión

La provincia de Córdoba concentra el mayor número y densidad de poblaciones silvestres de *H. annuus*, tal como se discutió en el Capítulo I y muestra valores relativamente altos en las tres medidas de diversidad genética. La densidad de poblaciones en esa provincia probablemente se debe a la dispersión ocurrida desde el punto de introducción. Se observó que los valores de variabilidad más bajos pertenecían a la provincia de Mendoza, lo que podría deberse al número reducido de poblaciones que se muestrearon. No obstante, los máximos valores de P, A y H se encontraron en la provincia de Buenos Aires, la cual también posee un escaso número de poblaciones. Estas observaciones podrían estar relacionadas con las características de esta provincia en cuanto a un transporte activo de semillas para cultivo o de cosecha hacia centros de comercialización. Toda la provincia de Buenos Aires se caracteriza por una gran cantidad de voluntarios de girasol en las banquetas de rutas.

Como ha sido mencionado, el modo en que esta especie fue introducida es impreciso, pero los parámetros de variabilidad genética no evidencian una importante reducción en la diversidad genética durante el proceso de introducción y naturalización. Las variantes alélicas características de especies cercanas a *H. annuus* han sido previamente descritas (Carrera y Poverene 1995; Carrera *et al.* 1996). En el presente estudio los valores de P resultaron similares tanto para el criterio de 0,01 como de 0,05 indicando un efecto menor de los alelos raros en la diversidad total. Solamente en la población de San Juan se observó una diferencia cuando fue aplicado uno u otro criterio. Las medidas de polimorfismo y heterocigosis para *H. annuus* naturalizado resultaron inferiores a las de poblaciones en su centro de origen. Niveles de diversidad similares a los encontrados en las poblaciones de Argentina se han observado en poblaciones silvestres de *H. annuus* en Australia, donde fue introducido como ornamental (Dry y Burdon 1986). Los procesos de domesticación y colonización frecuentemente reducen la diversidad genética de manera similar, en relación a las poblaciones nativas. Asimismo el contacto con el cultivo no tuvo un efecto significativo sobre las medidas de diversidad de las poblaciones dado que las poblaciones de Juárez Celman y Carhué, que habían estado en contacto con el cultivo mostraron medidas de diversidad similares a las de Río Cuarto y La Carlota, que no lo estuvieron.

El índice de fijación F_{IS} mostró una deficiencia de heterocigotas en la mayor parte de las poblaciones. Los valores de F_{IS} muestran la concordancia entre la cantidad de heterocigotos observados y esperados bajo equilibrio y constituyen una medida del grado de panmixis dentro de la población. Los valores obtenidos sugieren procesos endogámicos o la presencia de subestructura en la población. Los valores de F_{IS} positivos y negativos en la tabla 2.9 ponen en evidencia que existen loci con exceso y déficit de heterocigotos. La autoincompatibilidad y la polinización mediada por abejas, favorecen la fecundación cruzada en *H. annuus*. Sin embargo, ensayos con autofecundación forzada en nuestros lotes experimentales mostraron que algunos capítulos produjeron hasta un 20% del promedio de semillas obtenido en capítulos de polinización libre (Presotto 2004). La falta de equilibrio para el locus ACP podría deberse a los numerosos alelos hallados para esta enzima, por lo que la muestra analizada pudo haber resultado demasiado pequeña para reflejar los valores de variabilidad existente en ese locus. Las desviaciones respecto de las proporciones de equilibrio para todos los loci evaluados pueden atribuirse a la distribución en parches y al tamaño reducido de las poblaciones. Las pruebas de equilibrio para microsatélites manifestaron tanto exceso como deficiencia de heterocigotos y fueron consistentes con el tamaño reducido de las poblaciones, el flujo génico desde el cultivo y la alteración permanente de su hábitat.

El análisis de agrupamiento, basado en datos isoenzimáticos mostró una asociación entre las poblaciones más numerosas, pertenecientes a la provincia de Córdoba. Las restantes poblaciones, aisladas entre sí y localizadas en los límites de distribución de esta especie, no manifestaron asociación significativa entre la similitud genética y la distancia geográfica (Fig. 2.2). La carencia de concordancia entre la localización geográfica y el agrupamiento puede atribuirse a un modo de dispersión influenciado por la actividad humana (Cantamutto *et al.* 2009). Estos resultados fueron confirmados con las diferencias altamente significativas de las frecuencias alélicas entre poblaciones. El nivel de diferenciación genética entre poblaciones de *H. annuus* es comparable a los valores de G_{ST} informados para especies de ciclo anual (35%) pero es alto en relación a otras alógamas entomófilas (20%) o especies con sistemas de desprendimiento explosivo de las semillas (24%) (Hamrick y Godt 1990). Se ha demostrado que el polen de girasol alcanza distancias de 500 m bajo las condiciones climáticas locales (Ureta *et al.* 2008). Sin embargo, la ocurrencia de flujo génico aparentemente no previene la diferenciación genética.

El valor de $G_{ST}= 0,36$ es similar al obtenido en poblaciones de EEUU (Cronn *et al.* 1997). En el centro de origen de una especie, la diferenciación entre poblaciones puede estar asociada al proceso de dispersión y adaptación a diferentes ambientes durante largos períodos. Un alto grado de diferenciación en una especie recientemente introducida podría ser explicado por efectos combinados de deriva génica y múltiples introducciones. Como resultado de las prácticas agronómicas tales como control químico de malezas y laboreo de banquinas, las poblaciones silvestres pueden fluctuar considerablemente en tamaño y experimentar cambios genéticos al azar. El efecto fundador es otro factor que posiblemente contribuyó a las diferencias observadas. Frecuentemente las poblaciones que crecen a lo largo de los caminos pueden estar fundadas por un número pequeño de semillas. Las variantes moleculares de los híbridos en cultivo podrían modificar las frecuencias alélicas de las poblaciones silvestres cercanas y de este modo incrementar los niveles de diferenciación. (Rieseberg 1999a; Ellstrand *et al.* 1999; Ellstrand 2003).

Los resultados obtenidos tanto para isoenzimas como para microsatélites demuestran que las poblaciones naturalizadas mantienen niveles mayores de variabilidad genética que los materiales cultivados, cuyos alelos se encuentran en la mayoría de las poblaciones silvestres. Estos hallazgos estarían de acuerdo con estudios moleculares previos donde se observó que los girasoles domesticados poseían un subconjunto de alelos isoenzimáticos y RAPD de *H. annuus* silvestre (Rieseberg y Seiler 1990; Arias y Rieseberg 1995). Las diferencias más marcadas se encuentran en la enzima Adh, que mostró polimorfismos en ambos loci en las poblaciones silvestres y un extenso monomorfismo en más de 100 híbridos y líneas puras de diversos orígenes (Torres 1974; Carrera 2001). Los alelos de los materiales cultivados se hallaron en todas las poblaciones silvestres, con la sola excepción del alelo *Acp-1e*, característico de líneas endocriadas e híbridos, que se encuentra en baja frecuencia o ausente en las poblaciones locales. De un total de 15 alelos isoenzimáticos encontrados en las poblaciones silvestres, siete no se han detectado en los materiales cultivados (Carrera y Poverene 1995) mientras que no se han identificado alelos específicos del cultivo. El estudio basado en marcadores microsatélites mostró resultados similares, ya que los alelos de materiales cultivados se encontraban tanto en las poblaciones simpátricas como en las alopátricas. No se halló una tendencia definida que permita afirmar que las poblaciones simpátricas poseen frecuencias más altas de los alelos presentes en los materiales cultivados, lo que demuestra que la significación de la prueba en la Tabla 2.10 es debida a

diferencias de frecuencias alélicas entre poblaciones, sin aparente relación con la cercanía al cultivo. De este modo, la utilización de marcadores isoenzimáticos y microsatélites para detectar introgresión desde el cultivo sería limitada.

Capítulo III

Hibridación natural e introgresión entre girasol cultivado y silvestre

El flujo génico entre el girasol domesticado y las especies silvestres emparentadas ha sido estudiado extensamente en su centro de origen, donde los procesos de hibridación e introgresión se reflejan en caracteres del ciclo vital, morfológicos y moleculares (Arias y Rieseberg 1995; Whitton *et al.* 1997; Linder *et al.* 1998; Snow *et al.* 1998; Rieseberg *et al.* 1999b). *H. annuus* silvestre hibrida fácilmente con el girasol cultivado y el flujo génico hacia las poblaciones silvestres tiene lugar en EEUU en toda el área de cultivo de girasol (Burke *et al.* 2002a). *H. petiolaris* también hibrida con el girasol, aunque hay importantes barreras reproductivas entre ambas especies debido a factores cromosómicos y génicos, ya que difieren en al menos ocho translocaciones y tres inversiones (Rieseberg *et al.* 1995b; 1999b,c; Burke *et al.* 2004). La hibridación entre el cultivo y las especies silvestres emparentadas puede influenciar la ecología evolutiva de los taxa silvestres o malezas relacionados, especialmente cuando crecen en la misma área, tienen períodos de floración superpuestos y comparten vectores de polinización (Snow *et al.* 1998). La hibridación natural entre *H. annuus* silvestre y *H. petiolaris* en América del Norte ha originado tres especies homoploides, *H. anomalus*, *H. deserticola* y *H. paradoxus* (Rieseberg 1991, 2006).

Covas y Vargas López (1970) describieron por primera vez en Argentina plantas intermedias entre girasol, *H. annuus* var. *macrocarpus* y *H. petiolaris*. La hibridación experimental fue estudiada mediante citogenética (Ferreira 1980; Ferreira *et al.* 1988) y marcadores isoenzimáticos (Carrera y Poverene 1995) pero no se realizaron estudios detallados de la hibridación natural e introgresión entre estos taxa. Dentro de poblaciones naturales de ambas especies, en las banquinas y campos cultivados en el oeste de Buenos Aires, este de La Pampa y sur de San Luis se hallan frecuentemente plantas con caracteres morfológicos intermedios. Esas plantas podrían haberse originado de cruzamientos entre el girasol cultivado y las especies silvestres o podría tratarse de generaciones avanzadas de un genotipo cultivado. Estas últimas son comúnmente conocidas como “voluntarios” y surgen debido a la inevitable pérdida de semilla durante el proceso de cosecha de los cultivos (Reagon y Snow 2006). Debido a la presencia de voluntarios las poblaciones silvestres pueden continuar estando expuestas a flujo génico aún en ausencia del cultivo. Asimismo las plantas atípicas podrían provenir de la hibridación entre ambas especies silvestres.

La caracterización morfológica de una planta individual es insuficiente para determinar su origen, debido a la variabilidad de los rasgos (Heiser 1954). Los híbridos combinan alelos de ambas especies parentales y se asume que deberían ser fenotípicamente intermedios, si bien no siempre sucede de ese modo pues con frecuencia se observan fenotipos extremos en poblaciones de híbridos segregantes provenientes de cruces controladas (Rieseberg *et al.* 1999a). Del mismo modo, los caracteres morfológicos no siempre están asociados a marcadores moleculares que indican introgresión. Dorado *et al.* (1992) encontraron plantas que tenían la apariencia de *H. petiolaris* puras y poseían marcadores introgresados de *H. annuus* cultivado, en tanto no observaron introgresión en el sentido inverso; las plantas de fenotipo *H. annuus* carecían de marcadores específicos de *H. petiolaris*. La reducción en fertilidad y la menor aptitud biológica podrían ser indicadores más confiables de cruzamientos interespecíficas o del flujo génico entre el cultivo y plantas silvestres. La hibridación entre especies que poseen divergencias genéticas y cromosómicas produce generaciones híbridas que son menos viables o fértiles que los taxa parentales. La selección favorece a los híbridos segregantes de mayor fertilidad y uno de ellos puede formar un linaje híbrido estable si a su vez, se aísla reproductivamente de sus especies parentales (Rieseberg 2000).

Si las plantas de fenotipo intermedio halladas en los viajes de colección tuvieran efectivamente un origen híbrido, los estudios de progenie revelarían una segregación de los caracteres parentales, una reducida fertilidad y/o aptitud. El objetivo de este capítulo es confirmar el proceso de hibridación entre las especies silvestres y el girasol cultivado en ambientes naturales donde conviven ambos taxa. Para ello se analizaron los fenotipos de progenies de plantas de morfología intermedia halladas en la región central de Argentina.

Materiales y Métodos

Numerosas plantas con morfología intermedia se hallaron en distintas localidades pertenecientes a cuatro provincias (Fig. 3.1 y Tabla 3.1). Entre ellas, se seleccionaron para el estudio 33 plantas tomadas de un total de 14 sitios de colección: 31 se hallaron en poblaciones de la especie *H. petiolaris* o creciendo en condiciones aisladas, en pequeños parches a lo largo de caminos; una fue recolectada en un lote de girasol cultivado y otra fue hallada en una población silvestre de *H. annuus*. Esas plantas eran representativas de muchas otras que crecían en las poblaciones y

mostraban un fenotipo intermedio peculiar que las destacaban entre las plantas circundantes.

Figura 3.1. Distribución de poblaciones silvestres de *Helianthus* donde se recolectaron plantas de morfología intermedia, referenciadas mediante GPS con el programa Ozi Explorer. Las referencias son detalladas en Tabla 3.1.

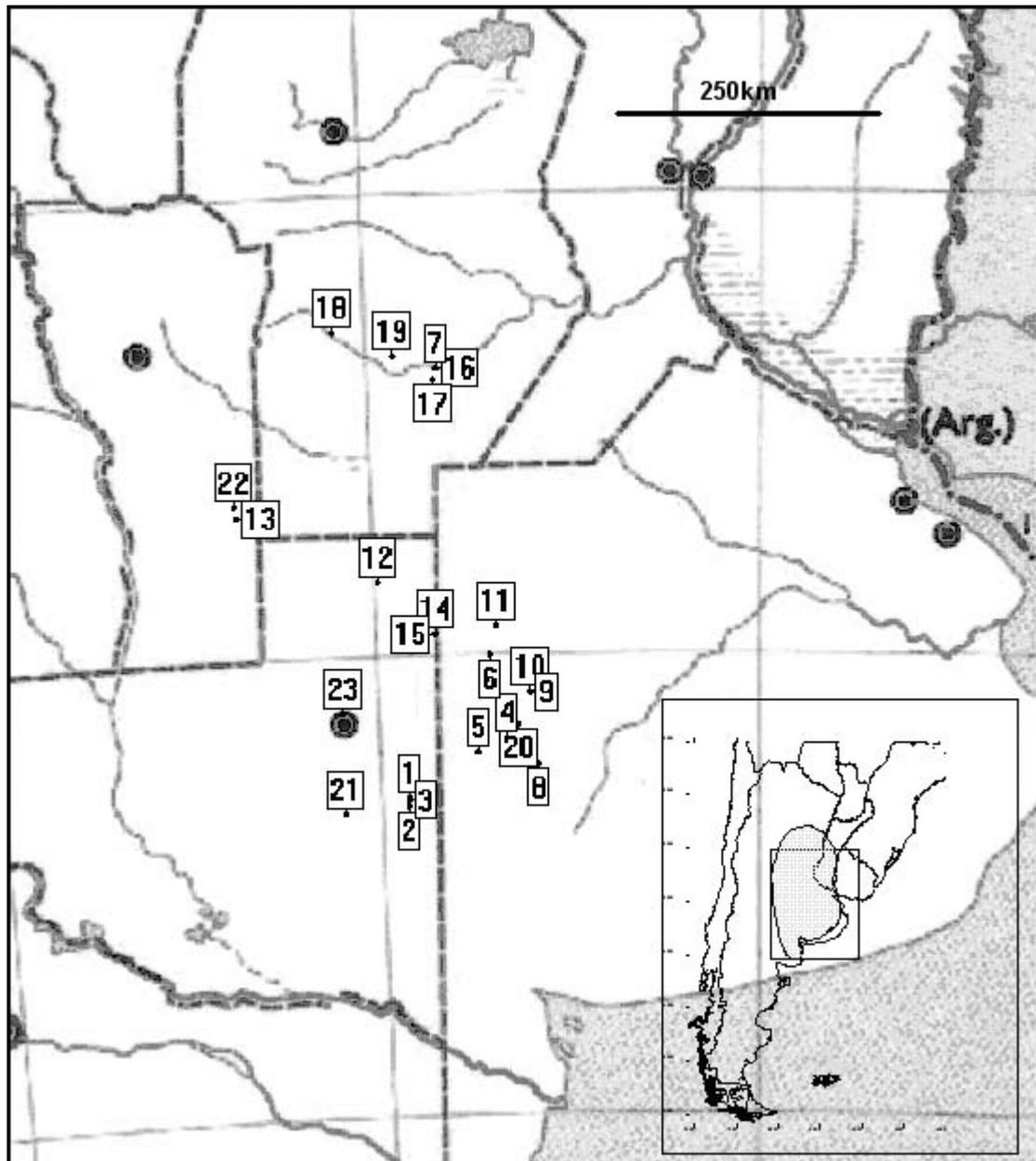


Tabla 3.1. Plantas estudiadas, población de origen, sitio geográfico y referencia en Fig. 3.1. Las plantas atípicas fueron identificadas de acuerdo a la población que les dio origen P (*H. petiolaris*), A (*H. annuus*), C (girasol cultivado) y S (Solitaria o aislada). Las poblaciones silvestres se identifican como Ann (*H. annuus*) y Pet (*H. petiolaris*).

Material	Poblaciones, N°colección ¹	Partido, Provincia	Ref. en Fig. 3.1
P1, P2	<i>H. petiolaris</i> 0900	Atreucó, LP	1
P3, P4	<i>H. petiolaris</i> 2300	Salliqueló BA	2
P5, P6	<i>H. petiolaris</i> 2500	Salliqueló BA	3
P7	<i>H. petiolaris</i> 3300	T. Lauquen BA	4
P8 a P15	<i>H. petiolaris</i> 1501	Guaminí BA	5
P16, P17	<i>H. petiolaris</i> 1901	T. Lauquen BA	6
P18, P19	<i>H. petiolaris</i> 5501	G. Dupuy SL	7
P20	<i>H. petiolaris</i> 5801	G. Dupuy SL	8
P21	<i>H. petiolaris</i> 5901	G. Dupuy SL	9
A1	<i>H. annuus</i> 3600	J. Celman C	10
C1	Cultivo de girasol 2601	T. Lauquen BA	11
S1, S2	Plantas aisladas 1000	Atreucó LP	12
S3, S4	Plantas aisladas 1200	Atreucó LP	13
S5 a S10	Plantas aisladas 5101	Realicó LP	14
Ann1	<i>H. annuus</i> 0401	J. Celman C	15
Ann2	<i>H. annuus</i> 0501	J. Celman C	16
Ann3	<i>H. annuus</i> 0601	Río Cuarto C	17
Ann4	<i>H. annuus</i> 0801	J. Celman C	19
Pet1	<i>H. petiolaris</i> 3301	Tres Lomas BA	20
Pet2	<i>H. petiolaris</i> 4501	Utracán LP	21
Pet3	<i>H. petiolaris</i> 5401	G. Dupuy SL	22
Pet4	<i>H. petiolaris</i> 6101	Capital LP	23

¹ Número de registro de colección del grupo de trabajo de la UNS.

El ensayo a campo se estableció con semillas de uno a tres capítulos de cada una de las 33 plantas atípicas. También se sembró una muestra de semilla de cuatro poblaciones de cada una de las especies silvestres *H. annuus* y *H. petiolaris* provenientes de otras tantas localidades. La progenie de cada planta intermedia fue considerada como una familia. Se colocaron las semillas en cajas de Petri con ácido giberélico 1mM para romper la dormición (Seiler 1998). Las plántulas obtenidas fueron colocadas en bandejas plásticas para almácigos con arena y turba (3:1v/v) en invernáculo, con riego diario. Cuando las plántulas tuvieron aproximadamente 10 cm de altura se transplantaron en el campo, en parcelas de 9 m de longitud dispuestas al azar. Cada parcela comprendía una familia con un máximo de 30 plantas espaciadas a 0,30 m con distancia entre parcelas de 1,4 m. Se suministró riego por goteo y se hizo control manual de malezas para asegurar un buen desarrollo de las plantas. En la periferia y a modo de bordura se sembró un híbrido de girasol cultivado (DK H3881).

La germinación fue evaluada en las cajas de Petri, excepto en las familias P18 y P19, que se sembraron directamente en campo debido a que fueron incluidas posteriormente en el ensayo. Luego del trasplante, se evaluaron los siguientes caracteres en cada una de las plantas presentes:

- Supervivencia de plantas hasta completar ciclo
- Altura de planta (m, estimada en intervalos de 0.5 m)
- Ramificación 0 a 4, desde no ramificado a totalmente ramificado desde la base, de acuerdo a la clasificación de Luczkiewicz (1975)
- Tipo de hoja: La morfología de la hoja se clasificó de acuerdo a si era cordada o subcordada con márgenes aserrados (*Annuus*), de forma triangular con base cuneada (*Petiolaris*) y aquellas que no pertenecían a ninguno de estos dos tipos (*Intermedia*).
- Presencia de antocianinas en tallos y pecíolos
- Días de trasplante a floración

Los siguientes datos fueron evaluados en tres capítulos por planta:

- Ancho de filarias (cm)
- Diámetro del disco (cm)
- Color del disco (amarillo, rojo)
- Color del pericarpio (gris, marrón, gris y marrón, otros)
- Diseño del pericarpio (liso, listado, maculado, listado-maculado)

- Pubescencia del pericarpio (1-4, de glabro a muy pubescente)
- Tamaño de semilla (mm)
- Viabilidad del polen (%)
- Número de semillas por capítulo (%)

La supervivencia fue evaluada cuando las plantas alcanzaron el estadio reproductivo y luego al completar el ciclo de vida, siendo 100% cuando las 30 plantas que fueron trasplantadas produjeron semilla.

La fertilidad se estimó mediante la viabilidad de los granos de polen y el número de frutos viables por inflorescencia y se comparó con datos equivalentes de plantas de ambas especies silvestres. Se contaron 300 granos de polen de cada planta, de al menos tres plantas por parcela. Se consideraron viables los granos completamente teñidos con el colorante de Alexander (1980). Los capítulos en antesis se agitaron sobre un portaobjeto para recolectar polen y se agregó una gota de colorante. El número de semillas viables por capítulo se tomó como el número de semillas llenas por capítulo sobre el número total de flores existentes en el capítulo.

Los rasgos de variación continua fueron analizados mediante componentes principales (PCA) de correlación carácter por carácter. Se graficaron los promedios y los desvíos estándares por parcela.

Se calculó un índice híbrido basado en un valor numérico de los rasgos categóricos: tipo de ramificación (0-4), presencia de antocianinas (0-1), color del disco (1-2), tipo de hoja (1-3). El índice de cada una de las plantas se obtuvo por la suma de valores para los cuatro rasgos evaluados (Briggs y Walters 1997). El mayor valor fue asignado a los taxa silvestres y el menor valor correspondió al genotipo cultivado. Los índices híbridos fueron graficados como histogramas.

Se obtuvo un gráfico de consenso por medio de análisis Procrustes de las variables categóricas y métricas (Gower 1975). Los análisis multivariados se hicieron utilizando el programa InfoStat (2006).

Resultados

Las plantas utilizadas como madres mostraron una alta proporción de semillas abortadas. La germinación fue de 2 a 60%. Muchas familias mostraron plantas con un severo retraso del desarrollo, debilidad y muerte prematura. Las familias S3, P2, P10 y P15 no sobrevivieron en el campo experimental y solamente una planta de la familia P19 logró sobrevivir. Se observó tanto debilidad como muerte prematura en las familias S2, S4, P1, P8, P9 y P14, como así también enanismo o fasciación en las familias P5, P6, P8, P11, P12 y P13. Muchas plantas que sobrevivieron dentro de esas familias produjeron capítulos tempranos con lígulas y brácteas anormales y murieron antes de alcanzar el estadio de antesis.

La germinación de semillas de las poblaciones silvestres fue lenta y luego del tratamiento con ácido giberélico, *H. annuus* germinó en un 50-60%, en tanto que *H. petiolaris* alcanzó un 40-50%.

La altura de planta varió desde menos de 0,5 m hasta casi 3 m. Se excluyeron de la medición las plantas extremadamente débiles. La Tabla 3.2 muestra los valores promedio por familia en germinación, supervivencia y altura de plantas.

Tabla 3.2. Germinación (%), supervivencia (%) y altura de plantas (m) en 29 familias sobrevivientes de plantas atípicas y ocho accesiones silvestres de *Helianthus*. Los números de identificación son los mismos que en la Tabla 3.1.

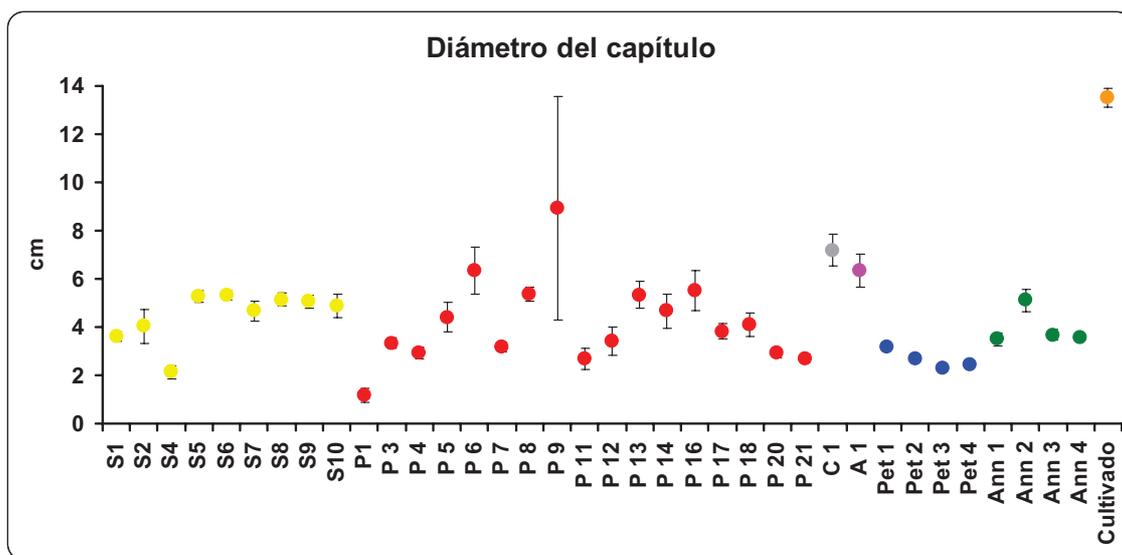
Material	Germinación	Supervivencia	Altura	Material	Germinación	Supervivencia	Altura
P1	20	3	<0.5	S1	50	23	0.5-1
P3	5	100	1.5-2	S2	45	10	0.5-1
P4	2	92	1.5-2	S4	2	11	0.5-1
P5	10	78	0.5-1	S5	40	86	1-1.5
P6	10	100	0.5-1	S6	50	100	1.5-2
P7	2	97	1-1.5	S7	20	81	0.5-1
P8	5	100	1-2	S8	45	100	0.5-2
P9	2	56	0.5-1	S9	45	95	1-2
P11	30	75	<0.5	S10	55	60	<0.5
P12	10	90	<0.5	A1	40	92	0.5-2
P13	30	90	0.5-1	C1	60	85	1.5-2.5
P14	30	75	0.5-1	Ann1	50-60	96	2-3

P16	5	81	1-1.5	Ann2	50-60	83	2-3
P17	10	93	0.5-1.5	Ann3	50-60	78	2-3
P18	sd ¹	100	1-1.5	Ann4	50-60	96	2-3
P19	sd ¹	1 planta	1.5-2	Pet1	40-50	100	1.5
P20	20	96	0.5-1	Pet2	40-50	82	1-1.5
P21	8	100	0.5-1	Pet3	40-50	100	1-1.5
¹ sin datos				Pet4	40-50	100	1-1.5

Una menor variación de caracteres métricos se observó en las entradas silvestres comparadas con las familias provenientes de plantas de morfología intermedias (Fig. 3.2).

En la Fig. 3.3 se muestra la fertilidad de las familias a través de la viabilidad de polen y número de semillas, juntamente con las accesiones silvestres y el girasol cultivado.

Figura 3.2. Caracteres morfológicos métricos (medias y desvíos estándar) en familias de plantas atípicas, entradas de *H. petiolaris* y *H. annuus* y el cultivar DK3881. Los colores identifican los distintos materiales: Amarillo: plantas aisladas, Rojo: plantas halladas en una población de *H. petiolaris*, Gris: Planta hallada en un cultivo de girasol, Rosa: planta hallada en una población de *H. annuus*, Azul: poblaciones de *H. petiolaris*, Verde: poblaciones de *H. annuus*, Marron: Girasol cultivado.



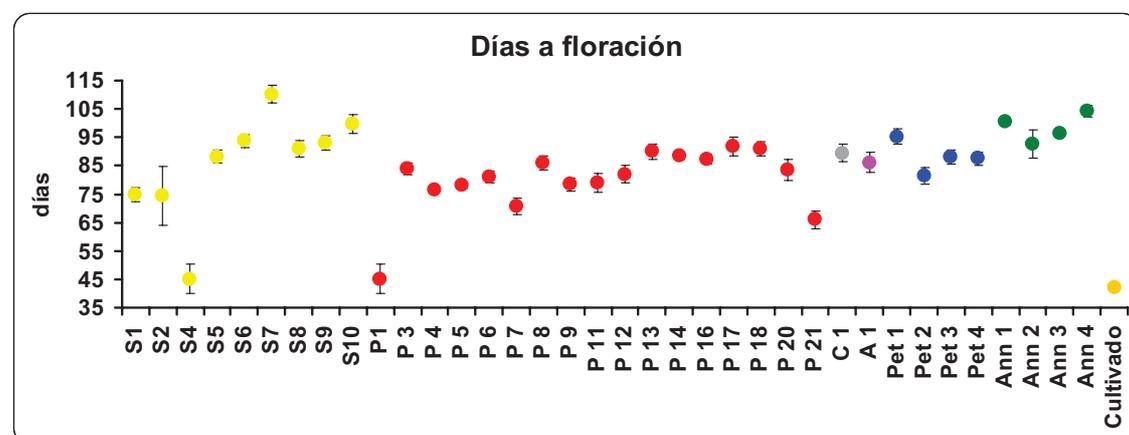
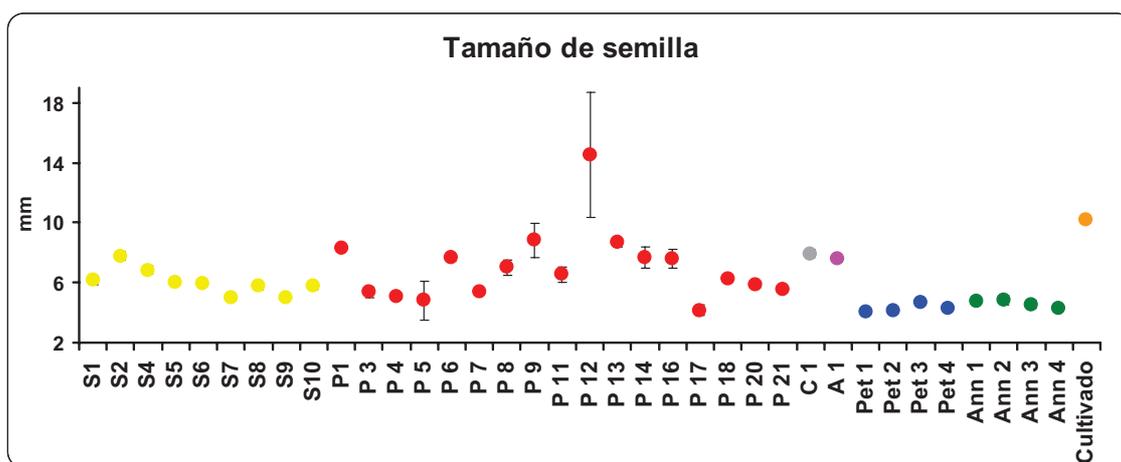
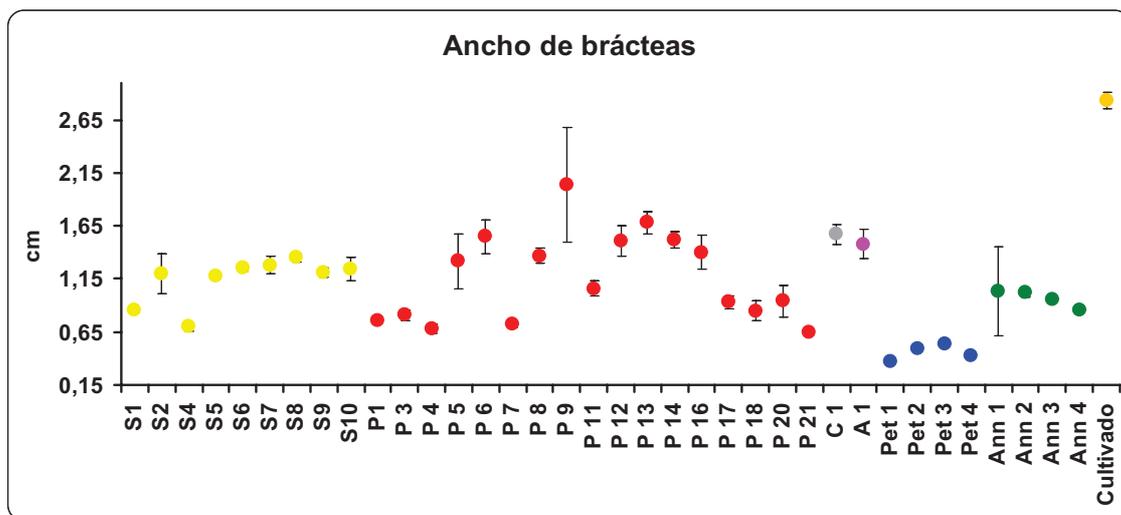
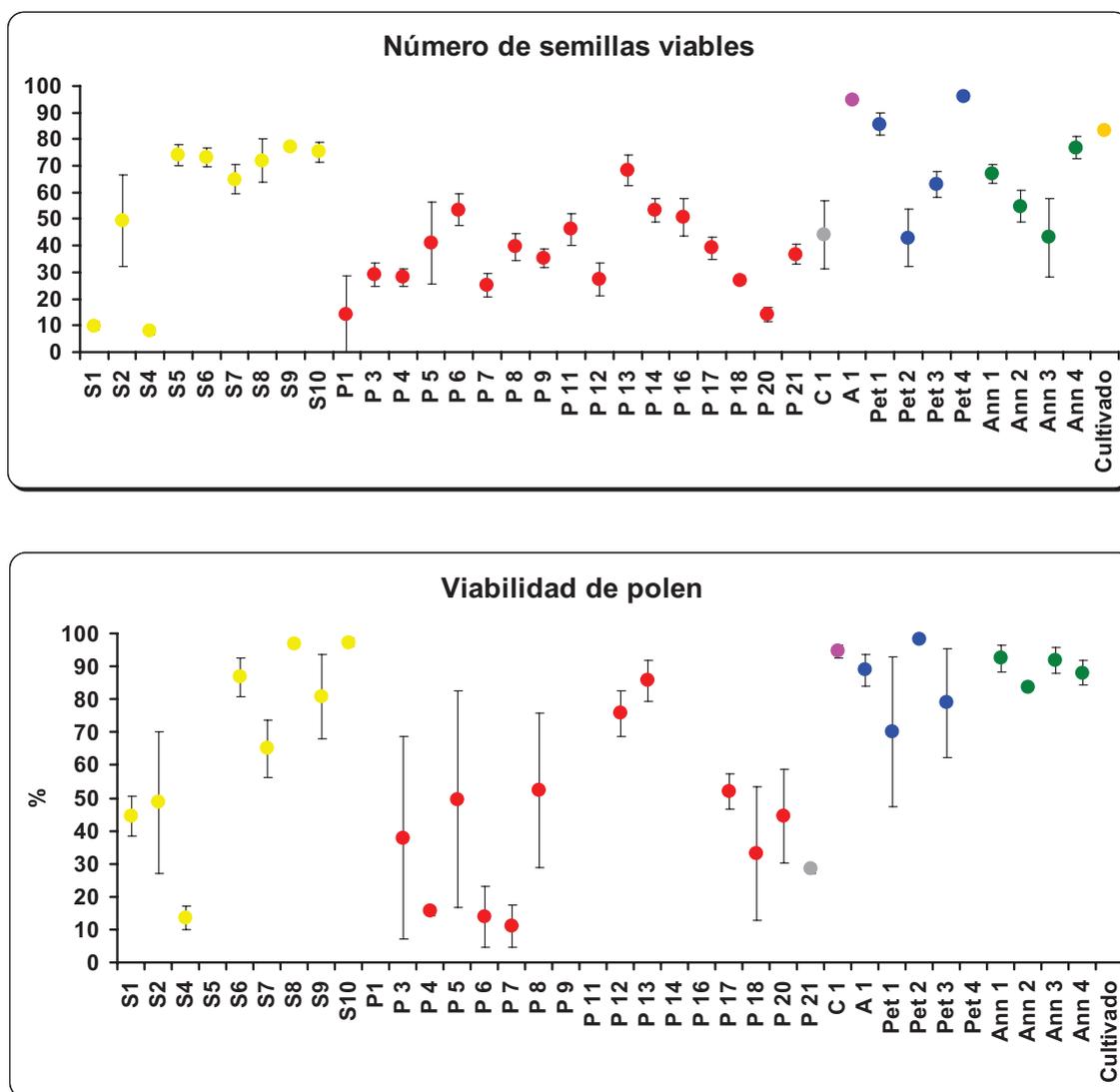


Figura 3.3. Caracteres de fertilidad en familias de plantas intermedias, entradas de *H. petiolaris* y *H. annuus* y el cultivar DK3881. Los colores identifican los distintos materiales. Código de colores como en la figura 3.2



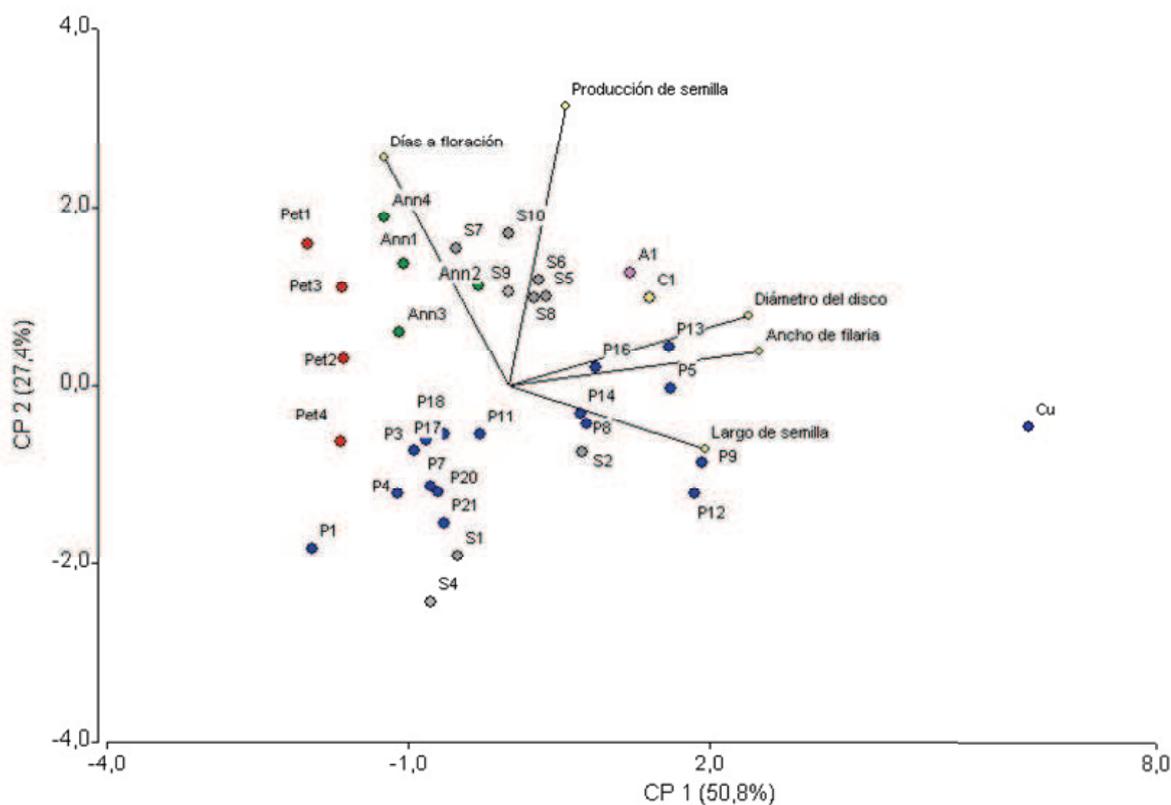
Se observó androesterilidad en una planta de cada una de las familias P16, S5 y S6 (Fig. 3.4).

Figura 3.4. Androesterilidad observada en las familias descendientes de las plantas de morfología intermedia.



En el Análisis de Componentes Principales (CPA) el primer componente estuvo determinado por el diámetro del disco y el ancho de filaría (brácteas). El segundo componente permitió una separación basada principalmente en la producción de semillas viables y los días a floración (Fig. 3.5). Los dos primeros componentes explicaron el 75% de la variabilidad existente.

Figura 3.5. Análisis de Componentes Principales (CPA) de las 29 progenies evaluadas (P1-P21; S1-S10; A1; C1), ocho poblaciones silvestres de *H. annuus annuus* (Ann1-4) y *H. petiolaris* (Pet1-4) y un genotipo cultivado (Cu).



Los rasgos categóricos tipo de ramificación, forma de la hoja, presencia de antocianinas, color del disco y apariencia de la semilla (color, diseño y pubescencia) fueron diferentes en las familias comparadas con las entradas silvestres (Tabla 3.3).

La mayor parte de las familias mostraron más de un tipo de ramificación, de acuerdo a Luczkiewicz (1975). Las plantas silvestres mostraron ramificación completa, sin presencia de capítulo principal, excepto algunas plantas de *H. annuus* que tuvieron ramificación superior (tipo 2) o capítulo principal (tipo 3).

La segregación del tipo de hoja fue frecuente dentro de las familias, pero generalmente hubo un tipo predominante. La mayoría de las plantas silvestres tanto de *H. annuus* como de *H. petiolaris* mostraron una coloración púrpura en tallos y pecíolos. Dentro de las familias, tres presentaron antocianinas en toda su progenie, cinco mostraron ausencia de antocianinas y el resto mostró segregación de la presencia del pigmento (Tabla 3.3).

En cuanto al color de las flores del disco, las accesiones de *H. petiolaris* mostraron un color púrpura intenso, mientras que el color rojo en los lóbulos de la corola caracterizó a las poblaciones de *H. annuus*. Siete familias tuvieron discos amarillos en todas las plantas, nueve tuvieron discos con lóbulos pigmentados y 13 segregaron para el color de los discos. No se observó color negro en las flores tubulares, las plantas que tenían discos amarillos poseían a su vez la corola color amarillo. Las lígulas fueron amarillas en las accesiones silvestres y progenies. Los pigmentos de antocianinas en flores y partes vegetativas estuvieron asociados y ambos rasgos segregaron en 12 familias para color del disco y en 20 para partes vegetativas.

El aspecto de la semilla fue muy variable. En las accesiones silvestres repredominó el color gris o marrón. En las familias también se observó color negro, oliva y blanco. Independientemente del color, el pericarpio fue moteado en las accesiones de *H. petiolaris* y presentó tanto listas como motas en las accesiones de *H. annuus*, mientras que en las familias varió entre completamente coloreado, maculado, listado, o ambos y muchos segregaron para varios tipos de pericarpio (Fig. 3.6). Las accesiones de *H. petiolaris* presentaron una densa pubescencia. En tanto, *H. annuus* y las familias variaron desde una pubescencia densa hasta casi glabras (Tabla 3.3).

Figura 3.6. Aspecto variable del pericarpio en semillas de descendencias de plantas atípicas: listado maculado (a), maculado (b), listado (c), glabro (a y c) y pubescente (b).

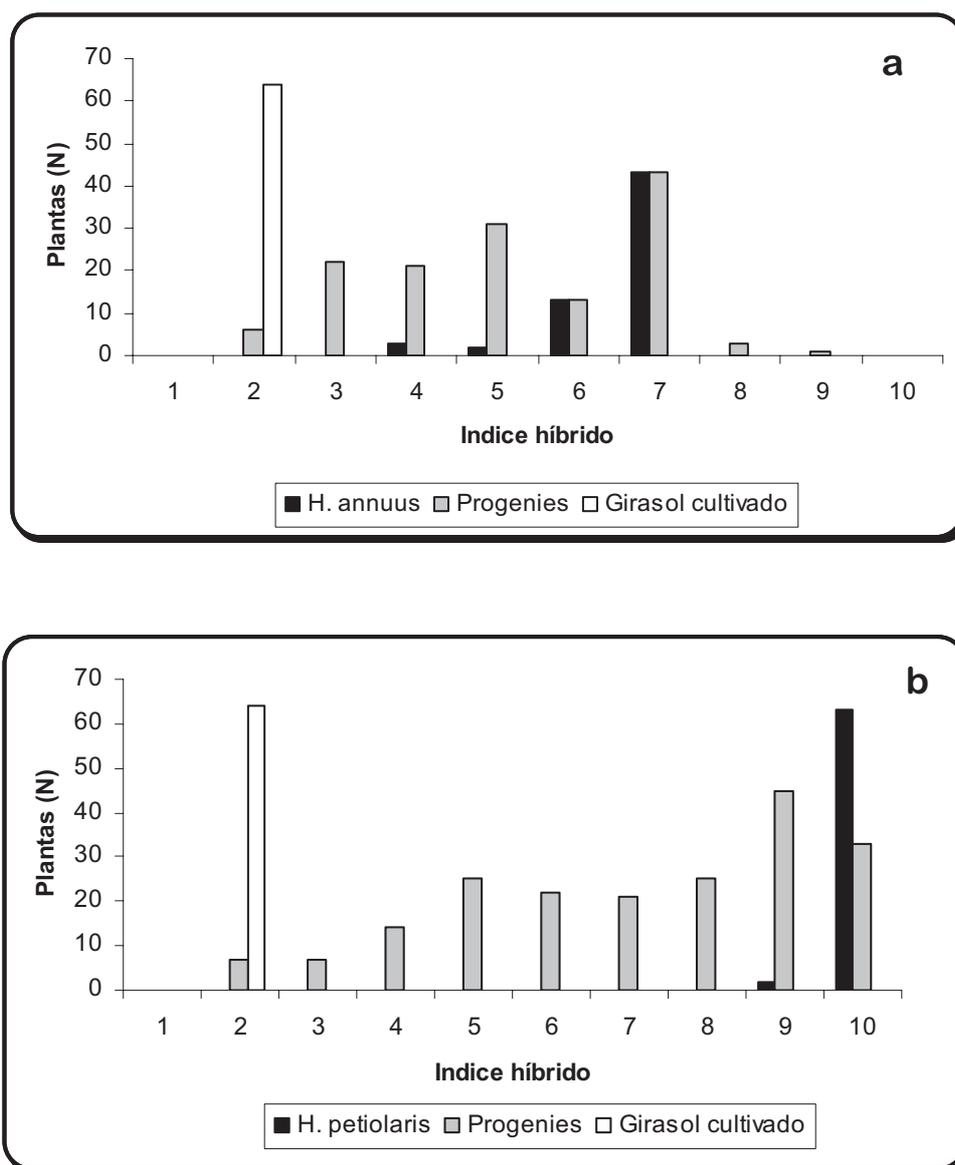


Tabla 3.3. Caracteres categóricos en familias y especies silvestres de *Helianthus*: ramificación (0-4); tipo de hoja (Annuus, Petiolaris, Intermedio); antocianinas (Presente, Ausente, % de plantas con P); color del disco (Amarillo, Rojo); color del pericarpio (Gris, Marrón, Oliva, Negro); diseño de pericarpio (Listado, Maculado, Listado-Maculado, Liso), pubescencia (1 a 4 de glabro a muy pubescente). S= segregación dentro de la familia. Múltiples fenotipos dentro de una familia se presentan separados por “/”.

Material (parcela)	Ramificación	Tipo de hoja	Antocianinas	Color de disco	Color de pericarpio	Diseño de pericarpio	Pubescencia pericarpio
P1 y P2	2	P	A	A	G	L	3
S1	4	S	P	R	S	LM/L	4
S2	2-4 S	A/I	17%P, S	S	S	L/LM	2
S4	4	I	66% P, S	R	G	LM/ M	2
P3	2-4 S	P//A S	76%P, S	R	M/G	LM/M/L	3
P4	0-4 S	P//A S	91%P, S	R	M/G	LM/L	3
P5	0-4 S	I/P S	44%P, S	S	G/M/O	LM/M/LISO	2
P6	0-4 S	A/I S	22%P, S	S	G/O	LM/L/M	2
P7	2-4 S	P//A S	20%P, S	R	S	LM/M/LISO	3
A	0-3 S	A/I	95%P, S	S	S	L	2
P8	0-2 S	A//P S	50%P, S	S	S	L/LISO/M	3
P9	0-2	A	11%P, S	A	G/N	LISO/M	1
P11	0-2	I	A	A	S	M/LISO	1
P12	2-4 S	A/I	22%P, S	A	G/O	LISO/L	1
P13	0-4 S	A	A	A	G/O	L/LISO	2
P14	0-4 S	A/I	A	A	S	LISO/L	2
P16	0-2 S	A/I	A	A	G/N	LISO/L	2
P17	0-4 S	A/I	40%P, S	S	S	L/LISO	2
C1	4	A	S	S	S	L/LM/LISO	2
S5	1-4 S	A/I	79%P, S	S	S	LM/L/M	2
S6	0-4 S	A/I	45%P, S	S	S	LM/L/M	1
S7	0-4 S	A/I	50%P, S	R	S	L/LM	2
S8	3-4	A	43%P, S	S	S	LM/L/LISO	1
S9	2-4	A	95%P, S	S	S	LM/L	1
S10	0-4 S	A	60%P, S	S	S	M/L/LM	2
P18	1-4 S	I/ A	80%P, S	R	M/G	LM/L/M	3
P19	1	A	P	R	M	M	4
P20	2-3	P/ I	18%P, S	S	S	LM/M/L	3
P21	2-3 S	P / I	77%P, S	R	G/M	LM/M/L	3
Ann1	3-4	A	78%P S	R	G/M	M/LM/L	2
Ann2	2-4	A	P	R	G/M	LM/L	2
Ann3	4	A	P	R	S	S	2
Ann4	2-4	A	86%P, S	R	S	LM	2
Pet1	4	P	P	R	G/M	M	4
Pet2	4	P	82%P, S	R	G/M	M	4
Pet3	4	P	P	R	G/M	M/LM	4
Pet4	4	P	P	R	G/M	M	4

El índice híbrido basado en cuatro rasgos categóricos mostró un valor intermedio entre los fenotipos parentales en la mayoría de las familias o progenies. Todas las plantas fueron gráficamente representadas, incluyendo especies silvestres y cultivadas puras (Fig. 3.7).

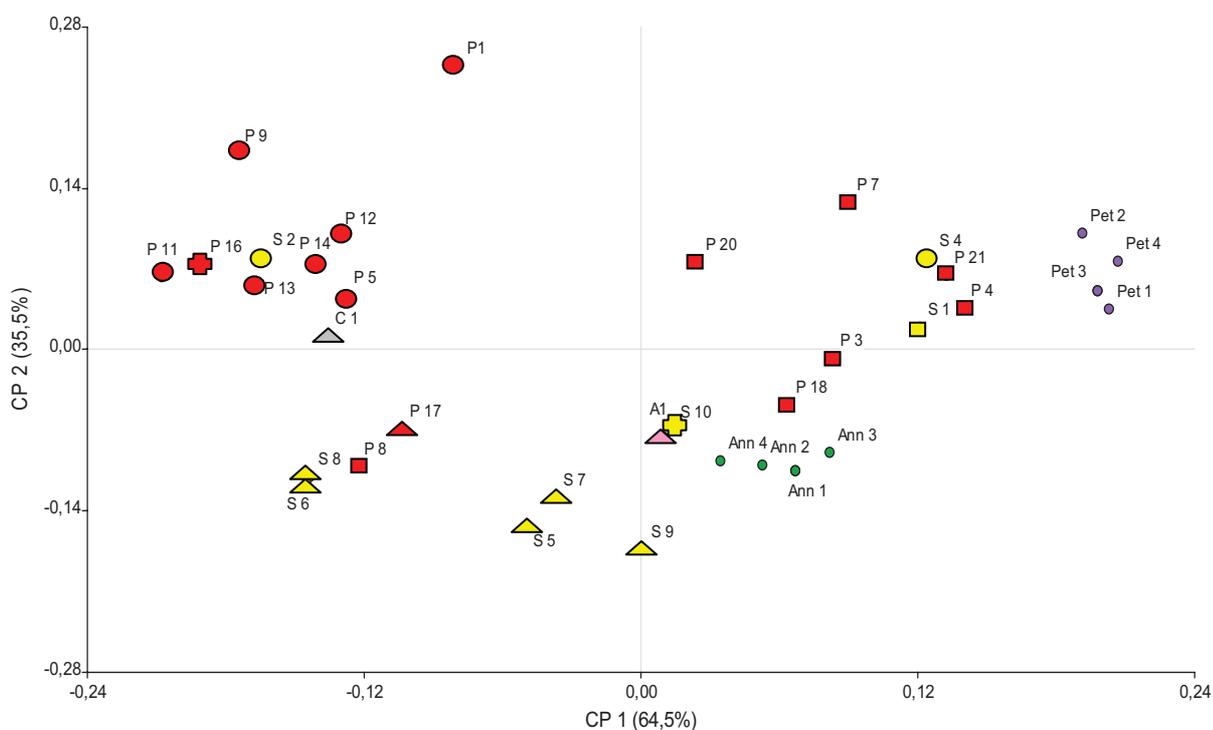
Figura 3.7. Índice híbrido basado en caracteres categóricos de *Helianthus* silvestres, girasol cultivado y progenies de 29 plantas atípicas. a) *H. annuus* silvestre. b) *H. petiolaris*.



Cuando los caracteres métricos y categóricos fueron combinados mediante el análisis Procrustes las familias mostraron una amplia distribución, en tanto las

entradas silvestres se mantuvieron agrupadas entre sí. Asimismo, las familias manifestaron una tendencia al agrupamiento según sus respectivos sitios de colección y el grado de fertilidad observado en las descendencias (Fig.3.8). Los dos primeros ejes explicaron el 81% de la variabilidad existente en todos los rasgos. El ANOVA mostró 82% de consenso entre caracteres métricos y categóricos.

Figura 3.8. Análisis Procrustes de las familias (P1-P21 rojo; S1-S10 amarillo; C gris; A rosa) y las entradas silvestres (Ann1-4=verde; Pet1-4=violeta). Las formas corresponden a las clases conformadas según su fertilidad, de menor a mayor: Clase 1 óvalos, Clase 2 rectángulos, Clase 3 triángulos, Clase 4 cruces.



Discusión

La hibridación entre el cultivo y las especies silvestres puede influenciar la evolución de los parientes silvestres o malezas, especialmente cuando las especies conviven y comparten el período de floración y los polinizadores (Snow *et al.* 1998). Una variación notable de fenotipos caracterizó a la mayoría de las familias analizadas para esta tesis, en comparación con las entradas silvestres de *H. annuus* y *H. petiolaris* creciendo en las mismas condiciones.

La escasa germinación en las muestras de semilla de las poblaciones silvestres, aún luego de un tratamiento hormonal, se puede atribuir a la dormición típica de ambas especies silvestres (Seiler 1998). Las semillas de las plantas madre de las familias fueron inviables o bien germinaron con mayor rapidez que las entradas silvestres. La dormición reducida de los híbridos cultivo-silvestre de girasol podría explicar la diferencia en la germinación entre las entradas silvestres y las familias, de acuerdo con lo observado por Snow *et al.* (1998). Muchas familias, como P1, P2, P8, P9, P10, P14, P15 y S2, S3, S4 mostraron plantas con un severo retraso en el desarrollo, enanismo, debilidad y muerte prematura que no son atribuibles a las condiciones de crecimiento. Estos eventos, así como la inviabilidad de las semillas, se podrían explicar como consecuencia de desbalances cromosómicos o genéticos en las progenies de cruza interespecíficas entre esos taxa (Rieseberg *et al.* 1995b, 1999c).

La variación en caracteres métricos fue mayor en las familias que en las entradas silvestres, en concordancia con lo descrito por Heiser (1947) en híbridos naturales y artificiales entre *H. annuus* y *H. petiolaris*, así como en otros híbridos interespecíficos dentro del mismo género (Nikolova *et al.* 1998). Las progenies provenientes de plantas fuera de tipo pueden mostrar tanto caracteres morfológicos parentales, intermedios o transgresivos (Rieseberg y Carney 1998; Rieseberg *et al.* 1999a). El diámetro del capítulo, ancho de brácteas, tamaño de semillas y días desde trasplante a floración en las familias fue generalmente intermedio entre las entradas silvestres y el girasol cultivado. Los datos del girasol cultivado, que corresponden al cultivar sembrado en el ensayo, fueron solamente indicativos debido a que los padres de cada progenie eran desconocidos. Las familias P1, S4, P20 y P21 mostraron un diámetro de disco menor que las poblaciones silvestres. Las poblaciones silvestres de *H. annuus* también mostraron una cierta variación en tamaño de disco, brácteas y semilla. Se observaron rasgos del cultivo en dos poblaciones que habían sido

colectadas en un área tradicionalmente dedicada al cultivo de girasol. Estas variaciones podrían deberse a que fueron expuestas por muchos años al flujo de genes desde el cultivo. Las poblaciones de *H. petiolaris* mostraron menor variación comparadas con *H. annuus*, en concordancia con lo observado en América del Norte (Heiser 1954, 1961).

El ciclo de vida de las progenies de plantas atípicas resultó algo distorsionado debido a que las entradas silvestres tuvieron una emergencia posterior a la de las familias de plantas atípicas. Este hecho explica el retraso en la floración de las plantas de *H. annuus* silvestre y *H. petiolaris*. Sin embargo, los datos son válidos para el propósito de comparación. Las dos familias que tuvieron un ciclo extremadamente corto probablemente provenían de generaciones tempranas de híbridos entre *H. petiolaris* y el girasol cultivado. La floración tardía de la familia S7 sugiere que el ciclo de vida puede ser transgresivo en los híbridos silvestre-cultivado. Si las plantas híbridas florecen más temprano que las silvestres, las mismas originarían una generación avanzada de híbridos y no progenies de retrocruza. Los híbridos transgresivos podrían tener así una oportunidad de establecerse en hábitats o nichos ecológicos ligeramente diferentes (Lexer *et al.* 2003). Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución ya que se basan en observaciones de una sola campaña. Los ciclos vitales de los híbridos y las especies silvestres a menudo se superponen, como se observó en los lugares de recolección de las plantas madres.

Las familias P1, S4, P20 y P21 mostraron una mayor esterilidad, señalada por la viabilidad del polen y el número de semillas. Las familias A1 y P14 tuvieron una muy alta fertilidad, mientras que las familias S5, S6, S8, S9, y S10 fueron casi tan fértiles como las entradas silvestres. La fertilidad muy reducida en algunas familias sugiere que las plantas madres podrían ser generaciones tempranas de híbridos interespecíficos. La recuperación de la fertilidad ocurre rápidamente luego de la hibridación, por selección natural (Heiser 1947; Rieseberg *et al.* 1999c). Asimismo, se espera una mayor fertilidad en los híbridos producto del cruzamiento entre *H. annuus* silvestre y cultivado, donde no existen barreras cromosómicas para el flujo génico y los alelos cultivados persisten en las generaciones silvestres durante varias generaciones luego de la hibridación (Whitton *et al.* 1997). La androesterilidad probablemente proviene de las cruces cultivado x silvestre, a través de plantas voluntarias (Reagon y Snow 2006).

La segregación de caracteres categóricos se consideró como una evidencia del origen híbrido de la planta madre que originaba las familias, aún cuando se espera una variación dentro de las poblaciones silvestres debido a que ambas especies son alógamas y auto-incompatibles (Heiser *et al.* 1969).

La ramificación tiene una herencia compleja (Miller y Fick 1997). Los tipos 0 (no ramificado), 2 (ramificado en la parte superior) y 3 (ramificaciones en toda la planta con un capítulo principal) están presentes en el girasol cultivado, mientras que 1 (ramificado desde la base) y 4 (ramificaciones en toda la planta sin capítulo principal) son típicos de plantas silvestres (Luczkiewicz 1975). La presencia de un capítulo principal en algunas familias y en plantas de *H. annuus* silvestre sería un indicio de flujo génico desde el girasol cultivado. Variaciones en la forma de hojas y en la presencia de antocianinas han sido consideradas evidencia de hibridación e introgresión con el cultivo (Bervillé *et al.* 2005). Los discos color amarillo sin pigmentación de antocianinas en las flores y con flores tubulares color negro son típicos del girasol cultivado. La variabilidad en el color de la semilla y la pubescencia también fue muy alta. El tipo de diseño listado estuvo presente en 25 de las 29 familias analizadas y es una característica dominante de muchas variedades antiguas de girasol cultivado en Argentina.

El análisis de componentes principales mostró una buena separación de los grupos. Plantas fuera de tipo mostraron una posición intermedia entre los extremos comprendidos por el girasol silvestre *H. annuus* (Ann1 a 4), *H. petiolaris* (Pet1 a 4) y el cultivo (Cu). El análisis de consenso de los caracteres métricos y categóricos confirmó estos agrupamientos familiares, colocando a las clases en cuadrantes diferentes, mientras que las poblaciones puras de las especies silvestres formaron dos agrupamientos separados. En tanto, el índice híbrido demostró que la mayoría de las progenies de las plantas presuntamente híbridas eran intermedias entre el girasol cultivado y las especies silvestres, dado que este método otorga el mismo valor de índice híbrido a plantas que son fenotípicamente diferentes (Briggs y Walters 1997) y no permite la diferenciación de las familias.

Teniendo en cuenta la viabilidad, la supervivencia, el sitio de colección y la morfología de las plantas analizadas, las familias se clasificaron en cuatro clases. La primera clase fue caracterizada por su escasa germinación, baja viabilidad y anomalías en el desarrollo. En las progenies P1, S2, S4, P9, P14 se observó una

mortalidad alta, mientras que en las familias P2, S3, P10 y P15 la pérdida fue completa. La mayoría de las plantas sobrevivientes murió antes de alcanzar el estadio de antesis o bien presentó un desarrollo anormal, mostrando fasciación y enanismo en las familias P5, P11, P12 y P13. Debido a que todas estas familias fueron originadas por plantas con características de *H. annuus* o intermedias creciendo dentro de poblaciones de *H. petiolaris*, las plantas madres serían probablemente la primera generación de una cruce interespecífica y las anomalías serían consecuencia de las diferencias genéticas entre las especies parentales.

La segunda clase mostró una germinación de 2 a 50%, con una variación fenotípica mayor entre plantas y esterilidad parcial. Las familias S1, P3, P4, P6, P7, P8, P20 y P21 segregaron en plantas tipo *petiolaris* y tipo *annuus*, mientras que P18 y P19 mostraron un tipo intermedio. Las plantas madres de estas familias eran principalmente de tipo intermedio creciendo en poblaciones de *H. petiolaris* y podrían representar una segunda generación de híbridos o retrocruzas con *H. petiolaris*.

La tercera clase de familias mostró una germinación entre 45 y 60%, excepto una familia que tuvo 20%. Las familias A1, P17, C1 y S5 a S9 tuvieron una variación más restringida a plantas tipo *annuus* y presentaron fertilidad relativamente alta. Las plantas madres mostraron un fenotipo típico de *H. annuus* silvestre y probablemente fueron originadas de cruzamientos entre *H. annuus* silvestre y cultivado. La situación más común es de polinización desde el cultivo hacia la especie silvestre receptora, aunque también se han hallado cruzamientos recíprocos en campos de producción de semilla (Reagon y Snow 2006).

La cuarta clase estuvo comprendida por las familias P16 y S10. Las mismas tuvieron una buena germinación y dieron una progenie uniforme, mostrando características de girasol domesticado. Algunas plantas poseían androesterilidad y un número bajo de semillas viables. Esta clase podría representar progenies provenientes de girasoles voluntarios y no serían producto de cruzamientos silvestre-cultivado. Los voluntarios y sus progenies son muy comunes en los bordes de ruta y de vías de ferrocarril. Los voluntarios pueden actuar como puente entre el cultivo y las especies silvestres (Reagon y Snow 2006), constituyen un reservorio de polen de genotipo cultivado y pueden transferir polen a las especies silvestres en zonas que son consideradas libres de cultivo.

Los materiales que conforman las cuatro clases definidas fueron asimismo agrupados en el análisis de consenso por todos los caracteres morfológicos estudiados.

La germinación parcial, la supervivencia y el número de semillas en la primera y segunda clases confirma la ocurrencia de hibridación e introgresión entre las dos especies, a pesar de las barreras cromosómicas y genéticas existentes (Rieseberg *et al.* 1995b, 1999b). La variación ambiental y la selección natural poseen un rol importante en este tipo de procesos. Las especies recientemente introducidas en un hábitat, que colonizan amplias extensiones, podrían difundirse rápidamente en suelos y ambientes similares, como así también hibridar con los taxa que se encuentren estrechamente relacionados. No obstante, casi todas las plantas fuera de tipo analizadas en este estudio fueron halladas en poblaciones silvestres puras y no había evidencias de que las poblaciones silvestres se encontraran creciendo juntas al mismo tiempo. En base a ello, la hibridación entre las especies silvestres de *Helianthus* fue descartada como posible origen de las plantas intermedias.

Estos resultados demuestran que la hibridación ocurre en todo el rango de distribución de las especies silvestres de *Helianthus* dentro del área de cultivo de girasol. Tanto las primeras generaciones híbridas como las generaciones avanzadas y las retrocruzas se pueden encontrar en el mismo sitio demostrando que la hibridación cultivado- silvestre y la introgresión son procesos recurrentes. Las plantas intermedias se encuentran más frecuentemente en la zona oeste de Buenos Aires y La Pampa, especialmente en los partidos de mayor producción de girasol.

Capítulo IV

Flujo génico entre girasol cultivado y silvestre

El flujo génico entre las plantas domesticadas y sus parientes silvestres tiene importantes consecuencias evolutivas para las poblaciones involucradas. La hibridación puede contribuir a la evolución adaptativa de las malezas a través de dos vías (Anderson y Stebbins 1954; Ellstrand y Schierenbeck 2000), 1) generando adaptaciones mediante segregación transgresiva y 2) transfiriendo caracteres que aumenten el rango de dispersión de las malezas invasoras (Ellstrand y Schierenbeck 2000) y/o la fecundidad de las malezas en las poblaciones locales (Ellstrand *et al.* 1999; Snow *et al.* 2003). En el primer caso, los híbridos segregantes exhiben fenotipos extremos y determinados cambios fenotípicos pueden llevar a una mayor aptitud de las malezas en algunos ambientes (Rieseberg *et al.* 1999a; Lexer *et al.* 2003). En el segundo caso, el flujo génico entre especies que coexisten ha sido objeto de numerosos estudios, especialmente aquellos enfocados a las zonas híbridas que permitirían el intercambio de material genético en alguna sección particular del genoma (Rieseberg *et al.* 1999b; Martinsen *et al.* 2001; Lexer *et al.* 2005; Yatabe *et al.* 2007). El tema ha recibido renovada atención a partir del cultivo a gran escala de variedades genéticamente modificadas (GM), debido a la posibilidad de que los caracteres introducidos de ese modo pudieran conferir ventajas adaptativas a las poblaciones silvestres, aumentando sus características invasivas o tornando difícil su control. No obstante, el flujo génico también podría favorecer el colapso de las poblaciones silvestres mediante depresión exogámica (Ellstrand 2003) causando erosión genética en recursos de germoplasma potencialmente útiles. Los cambios genéticos en las poblaciones silvestres constituyen un riesgo primario de los cultivos GM, aunque no es privativo de los mismos ya que cultivos tradicionales (no-GM) pueden modificarlas en forma similar y muchas malezas se han originado a partir de este tipo de contactos (Keeler 1989; Snow y Morán Palma 1997; Ellstrand *et al.* 1999; Conner *et al.* 2003; Vacher *et al.* 2004; Hails y Morley 2005).

Con frecuencia se producen eventos de hibridación e introgresión entre el girasol cultivado y las especies silvestres en Argentina, como se expuso en el capítulo anterior. Los resultados demostraron que la hibridación ocurre en todo el rango de distribución de las especies silvestres de *Helianthus* dentro del área de cultivo de girasol. La producción de polen de un híbrido de girasol cultivado es muy abundante y

sería esperable que fecundara un número elevado de flores de la especie silvestre. Otros potenciales receptores de polen son las plantas voluntarias que se encuentran con frecuencia en las banquinas o invadiendo campos donde se cultivó girasol. Como se mencionó previamente estos genotipos voluntarios pueden ser puentes entre el cultivo y las especies potencialmente invasoras (Reagon y Snow 2006).

Las condiciones agroecológicas de Argentina difieren de las norteamericanas y probablemente esto determine relaciones diferentes entre el cultivo de girasol y las especies silvestres de *Helianthus*. Por este motivo, el solapamiento geográfico fue estudiado previamente como se describe en el capítulo I y luego, con el fin de estimar el flujo desde el cultivo a las especies silvestres, se realizó un ensayo experimental basado en marcadores isoenzimáticos y microsatélites, debido a que los caracteres morfológicos resultarían insuficientes para reconocer y describir los híbridos entre *H. annuus* cultivado y silvestre (Rieseberg y Ellstrand 1993). Las isoenzimas han sido el marcador molecular más utilizado para estimar la frecuencia de hibridación entre los cultivos y las especies silvestres emparentadas (Ellstrand 2003). Esta técnica se ha utilizado por más de 40 años y permitió investigar los patrones de bandas isoenzimáticas en numerosas especies vegetales (Wendel y Weeden 1989). En un principio, con el advenimiento de los marcadores de ADN, se pensó que caerían en desuso (Rieseberg y Brunfeldt 1992), pero aún hoy siguen siendo marcadores predominantemente usados en los estudios descriptivos y experimentales de hibridación e introgresión. De acuerdo a Ellstrand (2003) ninguna técnica basada en ADN ha logrado reemplazar a los marcadores isoenzimáticos en la identificación de híbridos naturales; un relevamiento inicial con isoenzimas es el primer paso para confirmar la hipótesis de hibridación interespecífica y caracterizar la ocurrencia de introgresión.

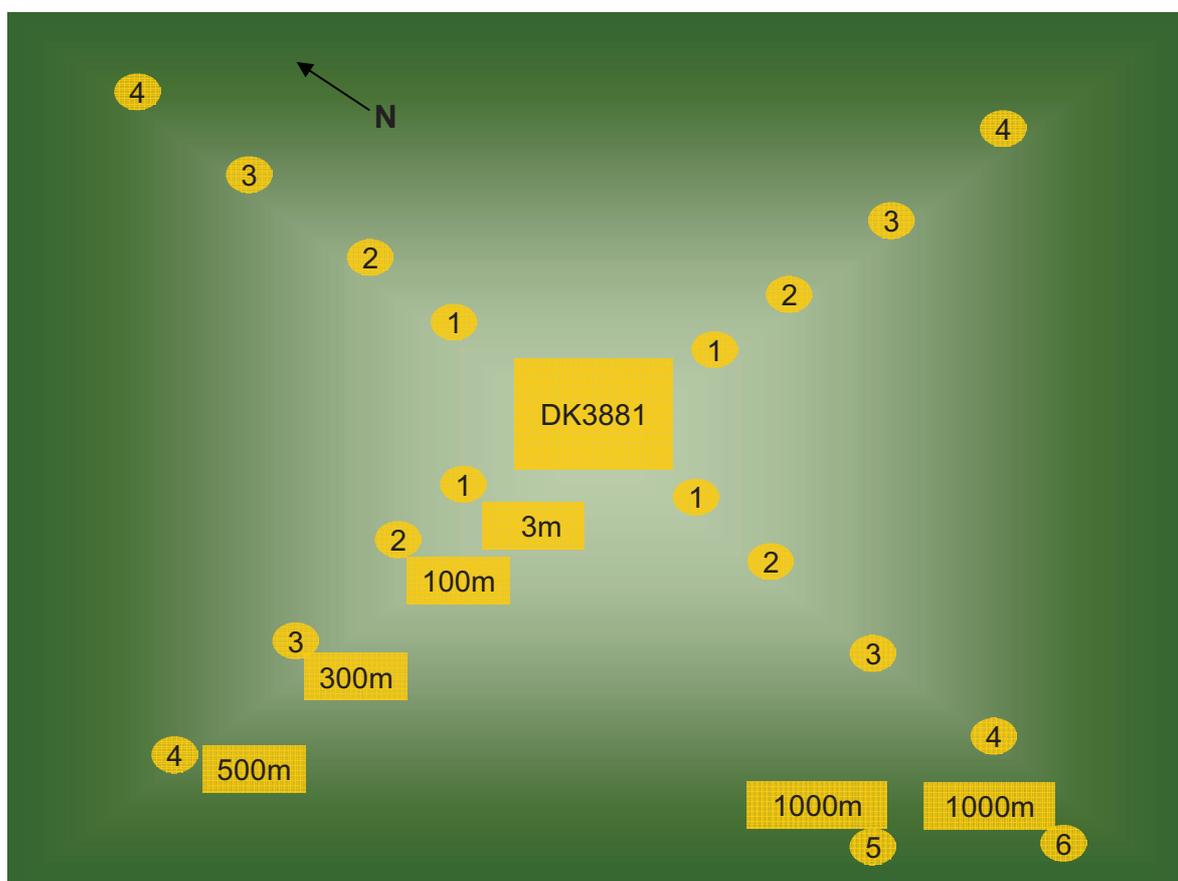
El objetivo planteado para este capítulo fue estimar la frecuencia de cruzamientos y tasa de flujo génico desde el girasol cultivado hacia *H. a. annuus* mediante la utilización de marcadores moleculares.

Materiales y Métodos

Ensayo de campo

Se estableció un diseño experimental en campo que permitiera simular las condiciones naturales de flujo génico entre el cultivo de girasol y las poblaciones silvestres de *H. annuus* (Arias y Rieseberg 1994). En el centro de un lote de 60 ha se sembró una parcela de 25 m x 25 m con el híbrido DK3881, en una densidad acorde con el cultivo comercial. La siembra se hizo escalonada semanalmente, a fin de asegurar una producción continua de polen durante la floración del girasol silvestre. Aproximadamente entre 1000 y 1250 plantas de girasol se encontraban en antesis cada semana. Alrededor de la parcela de girasol cultivado se establecieron 18 parcelas de 4 m² cada una, conteniendo al menos 10 plantas de girasol silvestre. Las parcelas fueron dispuestas a lo largo de cuatro ejes orientados de acuerdo a los puntos cardinales, a distancias de 3 m, 100 m, 300 m y 500 m, a las que se agregaron dos parcelas a 1000 m localizadas fuera del lote (Fig.4.1).

Figura 4.1. Diseño experimental comprendido por una parcela central del híbrido comercial DK3881, circundada por 18 parcelas de *H. a. annuus* a distancias de 3, 100, 300, 500 y 1000 m.



En los campos vecinos había colmenas suficientes como para asegurar la polinización por abejas. Las semillas de girasol silvestre germinaron en bandejas plásticas que contenían turba y arena en proporciones iguales (1:1). Las plántulas obtenidas fueron colocadas en macetas plásticas cuando alcanzaron 5cm de altura. Permanecieron en el invernáculo hasta su trasplante en el campo experimental, en el estadio de 4-6 hojas. Se colocó una protección a cada parcela, para evitar la destrucción de plantas por liebres u otros herbívoros (Fig. 4.2). Se verificó la ausencia de voluntarios, poblaciones o plantas aisladas silvestres que pudieran hallarse en la zona cercana al ensayo. Para evitar la pérdida de semilla por dehiscencia o ataque de pájaros, se protegieron con malla plástica todos los capítulos cuando alcanzaron el estadio R6 (Schneider y Miller 1981). Los capítulos maduros se cosecharon y embolsaron individualmente por parcela y planta. Para el análisis, se tomaron al azar 40-45 semillas del total de semillas de girasol silvestre producidas en cada una de las parcelas alrededor de la parcela central y se analizaron por electroforesis para determinar su constitución genética en el locus Acp-1.

Figura 4.2. Parcela central de girasol cultivado y plantas de *H. annuus* silvestre ubicadas a 3 m de distancia, protegidas por jaula de red.



Marcadores isoenzimáticos

Se utilizaron marcadores isoenzimáticos para obtener una estimación del flujo génico. La selección de los mismos se realizó en base a los resultados provenientes del relevamiento molecular realizado en poblaciones silvestres de *H. annuus*, cuatro híbridos comerciales (DK3881, 3900, 3915 y 4033) y la línea endocriada HA89, tal como se describió en el Capítulo II. En base a esos resultados, se eligió el híbrido comercial DK3881 y una población silvestre colectada sobre la banquina de la ruta provincial 4, departamento Juárez Celman de la provincia de Córdoba (identificada como C12 en Tabla 2.1) debido a que diferían en el locus de la enzima fosfatasa ácida Acp-1. Esta enzima presenta un alelo característico del girasol cultivado, Acp-1e, ausente en la población silvestre C12 utilizada para este ensayo (Fig 4.3a). La frecuencia de los híbridos silvestre-cultivo se calculó contando el número de individuos heterocigotos para ese locus sobre el total de individuos analizados en cada parcela. La tasa de dispersión de polen fue definida como el total de flujo de polen esperado a cada distancia evaluada, simulando una disposición de las plantas silvestres en círculos concéntricos alrededor de la parcela cultivada; se estimó multiplicando las frecuencias de híbridos por $3,14 (\pi)$ y por diámetro (d) a lo largo de los cuatro ejes. Los valores de frecuencia de híbridos se transformaron mediante raíz cuadrada arco seno. Se realizó un análisis de varianza para estudiar el efecto de la orientación de los ejes y la distancia sobre la frecuencia de híbridos.

Marcadores microsatélites

Con el propósito de hallar un marcador microsatélite (SSR) que permitiera asimismo cuantificar el flujo génico, se recolectaron hojas jóvenes de la población silvestre y del híbrido DK3881 en el estadio R1-R2 y se estudiaron los polimorfismos de SSR entre ambos materiales. Las secuencias de los 42 “primers” utilizados fueron desarrolladas en el laboratorio del Dr. Steven Knapp, en Oregon University (Tabla 4.1). Los protocolos utilizados para este marcador molecular y para isoenzimas fueron descriptos previamente en el capítulo II.

Tabla 4.1. “Primers” microsatélites ensayados para la búsqueda de polimorfismos entre el cultivo y las plantas silvestres implantadas. TA: Temperatura de hibridación (“Annealing”).

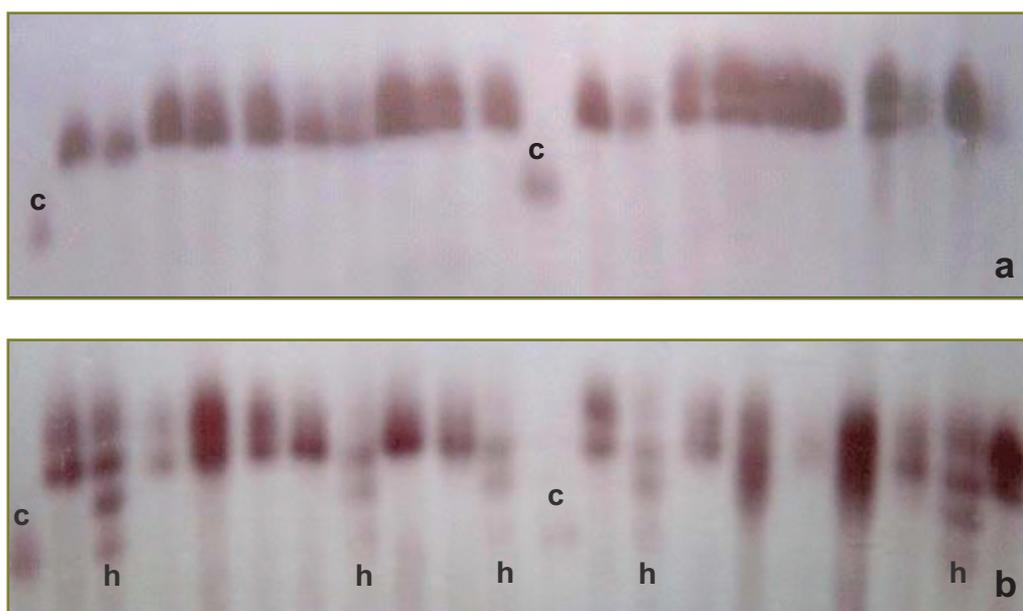
“Primer” SSR ORS	Secuencias repetitivas	“Primer” F	“Primer” R	TA (°C)
3	(AGT) ₆	AGAACTGGC AGCTTGAAAA	GTCCAAATGGTGGAAAACTAC C	52
4	(AGG) ₆	ACAAGTCGGCTGGTGAGC	ACATGAAACACCGAGCTAAACC	55
5	(AAC) ₄	ATGTGGAGCAGCAAAATTCAG	CTGCTGCCCCACCATACTG	55
7	(TCA) ₄	CCCTCACTACCGTGT GGT G	TTGAAAGAGACGAAAGCGAAA	52
8	(CT) ₈	TTGGATCGATTGATGATTGTTG	GAATCCGTCATGTATAAA ACG A	52
10	(AAT) ₉	CTCCACCACACAATCTCCG	TGT GGAGTTTGCCAGAACTG	52
12	(AAT) ₇	GCTTTGAGAAACCGCTTCAC	TTGATATGGTAACTAACGAAACACAA	52
13	(ATT) ₉	GAATAACCTGTGGAGTTTGCC	CCTCATTCTCATTCTCTCCACC	52
16	(AAT) ₉	GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	52
29	(AAG) ₄	TTAAGAAGAAGGAGAGAGGAAGA	AGTTGGATGAGTGGTGGAGG	55
59	(TCG) _{4n} (AG) ₆	GCTTCGTAGCTTCTTCTTCGC	AAGTAGCTTCGCAAGTATTCGG	55
70	(CTT) ₉	GACCCCTGGTCACCCGAAGTTA	ATCTGAAATCGGACAAGATTCA	55
78	(AAG) ₁₀	GTTTCGTGAGTACATGTTCTGC	TTTTCCCTCTGGAAAAGTTGTCA	55
176	(TG) ₁₆	CCCTAACTGGTTTTCTGACCC	AACTTTTGTGTTTTGTCCAGG	52
229	(CAA) ₁₂	TCCGACCCGAAATCTTATGAACC	GACCCGAAATGAGACCCCAAAACTG	52
297	(GT) ₁₂	TGCAAAGCTCACACTAACCTG	GTGTCTGCACGAACTGTGGT	57
299	(AC) ₇	TCGGCATCTCGTAAACATCA	CACGGTAGTTTGATTCGGTTT	57
316	(AC) ₁₁	TGGCGTCTTCATAGCATCAG	GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	57
317	(AC) ₁₁ (AT) ₈ (AG) ₆	TTTGGCAGTTTGGTGGCTTA	GGTCGTATGCCTTAATTCCTTCTCT	57

342	(GT) ₁₀	TGTTCATCAGGTTTGCTCCA	CACCAGCATAGCCATTCAAA	57
371	(GT) ₇	CACACCACCAAAACATCAACC	GGTGCCTTCTCTCCITGTG	57
383	(AC) ₆₀	TATGACCACGCCACTGACAC	ACACCTGTGTGAAATACTGTTGAAC	60
398	(AT) ₉ (GT) ₁₀ (AT) ₂ (GT) ₆	CACGTCCTAAATTAAGTAGGAACGA	CCAAGACCTCCGTTGAGCTAT	57
399	(AC) ₁₃ (AT) ₈	CGTACGGGTAGTTCTCATGGT	GGATCACGTGGCGTTCTATT	57
401	(GT) ₁₅	CCGGAAGACGGAAGAAGA	ACCTGAATCGAACGGTGTTT	57
407	(GT) ₁₃	TGGCTAGGATTGCTTCATCA	TTTGCTTGGCGTTCCTTACCT	57
420	(GT) ₁₃	TCATGGTGTGGTTTGTC	TGCCAAAATTCCTCTCTTTCT	54
428	(GT) ₁₂	TGCATTGATCAAAAGTTG	CATCACATCATATCATCTCATCATG	57
442	(GT) ₈ (GA) ₇	TGGGTGTTTCCCATTTGAATA	ACGTAGTGCATAAAAGATAAACCCAGAA	57
447	(ACAT) ₂₈ (AC) ₈	GAACACCACCACTCGGATTT	GCACCTCCTCTTCTTACATTT	57
453	(GTGTT) ₁₂	CCTGTGAGCTACAATACTCCCACA	GATTCTGATTAGGCGGTGGT	57
457	(AC) ₁₂ (CT) ₆	TGCATACCCCAATCTACCAGCTA	AAGACGAAGGTGCAACCAGT	57
519	(GT) ₁₂ (GA) ₂₀	TCGTTTTGCTTTGGTGATGT	CTACCCCTTCTCCATTGCTG	57
533	(CT) ₁₇	TGGTGGAGGTCACATTGGA	AGGAAAGAAGGAAAGCCGAGA	57
534	(CT) ₁₇	TCCAAACTCTCTCCCCCTCT	GCAGCGAAATAGGAAAAACG	57
543	(CT) ₂₃	CCAAGTTTCAGTTACAATCCATGA	GGTCATTAGGAGTTTGGGATCA	57
623	(CT) ₁₇	CTCCGTGACATCCAGACAAC	GACCCGGCCACACCCCTAAA	54
643	(AG) ₅	TCATCAAGGCAAGTAGCATCA	CCTCATCCGAAACCCATTAG	57
674	(CT) ₁₀	ACATGAGGGCAAAACAGACA	GCACAAAAGACAACCCACACCA	57
687	(CT) ₁₄	ACCGTTACACTTATTGGTTATTTCA	GGGGTTTGTGTTCTGTTTTG	57
691	(CT) ₁₉	GCATCTGAGCAACTGCGTTA	ACCGTCTTAGCTCTTGTGAG	60

Resultados

El análisis isoenzimático previo mostró que todos los alelos hallados en los materiales cultivados estaban presentes en al menos una de las poblaciones silvestres, motivo por el cual no fue posible identificar alelos útiles para el estudio de flujo génico dentro de la colección completa. Sin embargo, DK3881 resultó homocigoto para el alelo más lento de fosfatasa ácida, Acp-1-e, que fue raro en las poblaciones silvestres y estaba completamente ausente en la población C12 (Fig. 4.3 a, Tabla 2.1), razón por la cual este marcador fue elegido para el análisis. La progenie híbrida fue fácilmente identificada por la presencia de bandas ausentes en las plantas madres, mostrando el típico patrón heterocigoto de tres bandas (Fig. 4.3b).

Figura 4.3. Zimogramas de Fosfatasa ácida (locus Acp-1) a. Población C12 y alelo característico del girasol cultivado, Acp1-e (c) b. Progenie de poblaciones silvestres recolectada a 3 m del cultivo, mostrando híbridos silvestre-cultivo (h).



Sobre 760 plantas analizadas, 53 (7%) demostraron ser híbridos silvestre- cultivo. Las frecuencias por parcela oscilaron entre 0 y 0,275. La media y desviación estándar para cada distancia se muestran en la Fig.4.4. La frecuencia promedio de hibridación fue inversamente proporcional a la distancia (Tabla 4.2). No se halló evidencia de flujo génico en las parcelas situadas a 1000 m, donde ninguna semilla mostró el fenotipo heterocigoto. Las frecuencias de híbridos mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre distancias. No se detectaron diferencias significativas en el flujo génico para la misma distancia entre los cuatro ejes correspondientes a los puntos cardinales. La tasa de

dispersión del polen alcanzó su valor máximo a la distancia de 300 m (Fig. 4.5 y Tabla 4.3).

Tabla 4.2. Frecuencias netas y promedios del marcador del cultivo en la progenie de girasol silvestre para cada repetición en las cinco distancias evaluadas.

Repeticiones	3 m	100 m	300 m	500 m	1000 m
1	0,125	0,038	0,150	0,000	0,000
2	0,200	0,125	0,000	0,050	0,000
3	0,125	0,150	0,025	0,025	-
4	0,275	0,025	0,000	0,000	-
media	0,181	0,084	0,044	0,019	0,000

Figura 4.4. Frecuencias del marcador del cultivo en la progenie del girasol silvestre evaluada. Cada punto representa la media y el desvío estándar correspondiente a la distancia a la que cada población silvestre se hallaba de la parcela central del cultivo (N= 40-45 plantas por distancia).

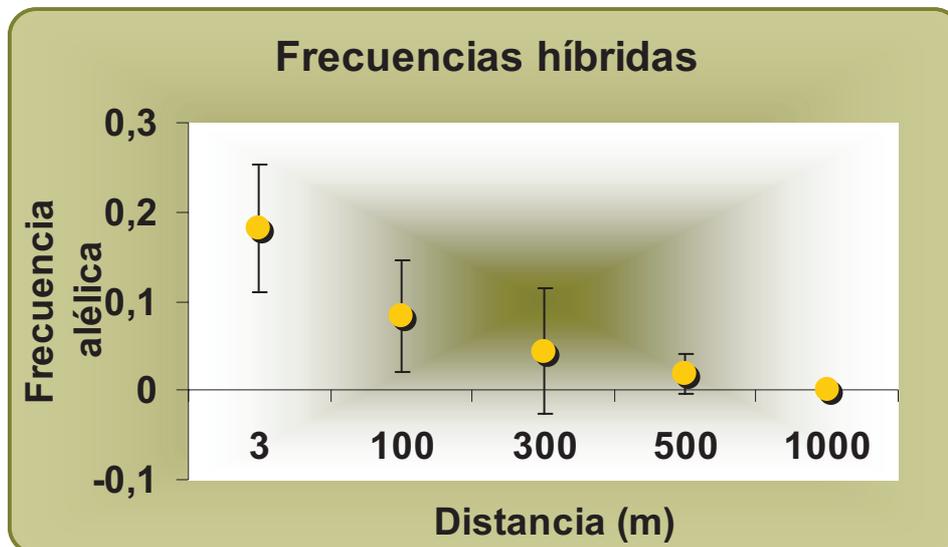
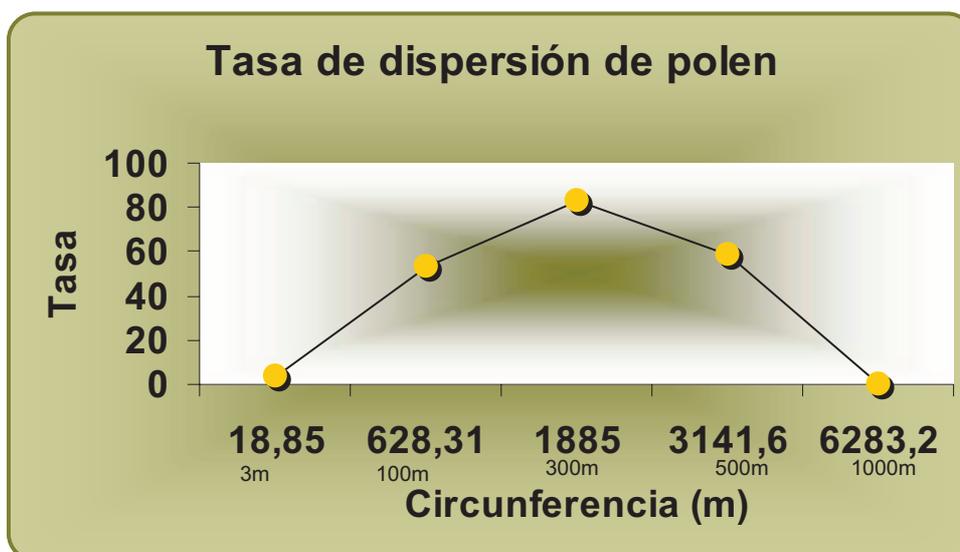


Tabla 4.3. Tasa de dispersión de polen del cultivo a las parcelas de girasol silvestre, para las cinco distancias evaluadas (d) de acuerdo a las frecuencias promedio (fc) de híbridos obtenidos.

Distancia (m)	Frecuencia Promedio (fc)	$\pi \cdot d$	$\pi \cdot d \cdot fc$
3	0,181	18,85	3,41
100	0,084	628,31	52,78
300	0,044	1884,95	82,94
500	0,018	3141,60	56,54
1000	0	6283,18	0

Figura 4.5. Estimación de la tasa de dispersión de polen desde la parcela central de cultivo hacia las parcelas de girasol silvestre para las cinco distancias evaluadas.



El ADN obtenido para el análisis de microsatélites fue de buena calidad. De un total de 42 loci SSR analizados, 28 presentaron entre dos y ocho variantes alélicas, cuatro resultaron monomórficos (Tabla 4.4) y 10 no dieron producto de amplificación (ORS-7, 8, 176, 398, 420, 447, 453, 533, 691, 774). Todos los alelos del girasol cultivado obtenidos con cada uno de los “primers” se hallaron presentes en la población silvestre.

Tabla 4.4. Alelos obtenidos mediante análisis de microsatélites en una población de *H. annuus* silvestre y el híbrido DK 3881.

“Primer” ORS	tamaño de los alelos (pb)	N° de alelos
3	250-225	2
4	175-150	4
5	mayor de 300	4
10	150-125	2
12	200-175	1
13	175-150	2
16	150-125	3
29	150-100	3
59	200-150	5
70	125-175	4
78	175-150	3
229	175-125	3
297	230	8
299	270-285	1
316	150	1
317	225-175	4
342	mayor de 300	7
371	265-280	4
399	260-270	3
401	175-150	1
407	mayor de 300	2
428	200-225	2
442	mayor a 300	2
457	250-200	4
483	275-250	4
519	275-200	4
534	275-225	3
543	300-250	5
623	250-200	5

643	mayor de 300	2
674	mayor de 300	3
687	175- 150	2

Discusión

La estimación de frecuencias de hibridación constituye el primer paso en la evaluación de los riesgos asociados con el escape de genes desde el cultivo a las especies silvestres emparentadas. Como se mencionó anteriormente las especies silvestres de girasol conviven con el cultivo en casi la totalidad de su rango de dispersión y a su vez, comparten períodos de floración y polinizadores, observándose, en el capítulo anterior, que en parte producen descendencia fértil. En el experimento realizado bajo condiciones controladas se comprobó el flujo génico entre el girasol cultivado y silvestre en condiciones de campo y se logró cuantificar mediante marcadores isoenzimáticos. La frecuencia promedio de híbridos silvestre-cultivo fue de 7%, comparable con la obtenida en México (10%) por Arias y Rieseberg (1994). Teniendo en cuenta que la región donde se realizó el ensayo se caracteriza por poseer temperaturas más extremas y menor humedad en comparación con la región tradicionalmente dedicada al cultivo de girasol, se podría esperar una tasa de hibridación aún mayor en las zonas donde se desarrolla el cultivo. Arias y Rieseberg (1994) también hallaron diferencias en la frecuencia de hibridación en dos sitios estudiados. La distancia y la dirección de movimiento del polen no mostraron diferencias significativas, lo cual indicaría que no hay efecto del viento sobre la actividad de los polinizadores. La frecuencia de híbridos disminuyó a la mitad desde una distancia a la siguiente y no fueron hallados híbridos más allá de los 500 m. Este resultado y la tasa máxima de dispersión confirmarían la distancia de aislamiento de 3000 m propuesta por CONABIA, para el buen manejo del cultivo de girasol GM en Argentina (CONABIA 2009). La distancia es el método más utilizado para prevenir el escape de genes entre el cultivo y las especies silvestres compatibles. Sin embargo, la dispersión del polen variará según las condiciones ecológicas, como el comportamiento de los polinizadores, la abundancia de las malezas, las dimensiones de un cultivo a escala comercial y los patrones de floración.

Dado el número de “primers” SSR utilizados para este estudio y la dificultad para obtener un marcador propio del girasol cultivado, esta metodología podría considerarse poco efectiva para un estudio de flujo génico entre *H. annuus macrocarpus* y *H. annuus var. annuus*. Sin embargo, debido a que los alelos del girasol cultivado pueden persistir en las poblaciones silvestres durante muchas generaciones (Arias y Rieseberg 1995, Whitton *et al* 1997, Linder *et al.* 1998), no se descarta la posibilidad de que la población de

girasol silvestre utilizada para este estudio haya tenido algún contacto con el cultivo y debido a ello, todos los marcadores analizados resultaron compartidos entre la forma silvestre y la cultivada. Otra de las causas posibles es que a pesar de exhibir diferencias fenotípicas marcadas, pertenecen a la misma especie y son completamente interfértiles.

De acuerdo a nuestros estudios acerca del área de contacto silvestre-cultivo en el país (Capítulo I y Poverene *et al* 2002), las frecuencias de hibridación y la fertilidad de los híbridos (Capítulo III), el girasol se ubicaría en el grupo de cultivos de alta probabilidad de transferencia de transgenes (Ahl Goy y Duesing 1996). Los híbridos generados entre el cultivo y las especies silvestres suelen mostrar algunas deficiencias de fecundidad cuando se los compara con los tipos silvestres puros, tales como menor número de flores o un reducido número de semillas por planta (Snow *et al.*1998), aunque esto no evitaría la dispersión de genes. Asimismo, el flujo de polen puede ocurrir en sentido inverso. Se observó 3,75% de descendencia híbrida en progenies provenientes de un lote de girasol invadido por *H. annuus* (Ureta *et al.* 2008). Esto afectaría la producción comercial de semilla de girasol, ya que tanto las poblaciones silvestres de *Helianthus* como los voluntarios pueden convertirse en reservorios de polen de cultivos GM (Reagon y Snow 2006). Las investigaciones sobre riesgos asociados al escape de transgenes en este cultivo deberían focalizarse en la aptitud biológica otorgada por el gen transferido (Burke *et al.* 2002b). Las consecuencias del flujo génico sobre la aptitud biológica deben ser evaluadas por un estudio demográfico tanto de poblaciones de híbridos cultivo-silvestre naturales como obtenidos experimentalmente (Hails y Morley 2005; Hooftman *et al.* 2005; Mercer *et al.* 2006). Actualmente las especies silvestres de *Helianthus* no son consideradas nocivas en Argentina y no podríamos anticipar que la liberación de girasoles GM deviniera en un impacto significativo. El extenso solapamiento entre el área dedicada al cultivo de girasol y las especies silvestres, y la persistencia de los híbridos cultivo-silvestre, demuestra la alta probabilidad de flujo de genes en Argentina.

Capítulo V

Evaluación del impacto ambiental mediante el carácter resistencia a Imazapir

Helianthus annuus ssp. annuus es la especie del género de mayor distribución geográfica en América del Norte (Rogers *et al.* 1982). La primera población de *H. annuus* silvestre resistente a Imazetapir se encontró en Kansas, EEUU, en un lote de soja luego de siete años de aplicación de este herbicida (Al-Khatib *et al.* 1998). Aparentemente provenía de una mutación natural. Como consecuencia de este descubrimiento surgió la tecnología Clearfield® en girasol, que otorga tolerancia a principios activos de la familia imidazolinonas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima acetolactato sintasa (ALS) afectando la síntesis de los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina y valina (Shaner *et al.* 1984). La resistencia a imidazolinonas (IMI) hallada en girasol silvestre se debe a la presencia de una forma alterada de ALS que la hace insensible al herbicida. Hall *et al.* (2000) encontraron que era un rasgo semidominante gobernado por dos genes (I^A , I^B) donde la presencia de cualquiera de ambos era suficiente para conferir resistencia. Burniard y Miller (2001) sugirieron que la resistencia a IMI se debía a dos genes, uno mayor *Imir1*, con efecto semidominante y un gen menor *Imir2*, con efecto modificador cuando se hallaba presente el gen mayor. La resistencia total sólo se lograría cuando ambos genes se encuentran en homocigosis (*Imir1 Imir1*, *Imir2 Imir2*).

Los primeros híbridos comerciales IMI resistentes de girasol fueron liberados al mercado por la empresa Basf en 2003. En nuestro país, esta tecnología ha sido recientemente incorporada en el cultivo de girasol y hasta la fecha no se ha documentado resistencia en las especies silvestres locales. La transmisión de genes de resistencia a herbicida desde los cultivos a las especies silvestres podría generar otros biotipos nocivos y de difícil control (Ellstrand 2003). La transferencia de este carácter se ha evidenciado en numerosas especies, como *Brassica* (Brown y Brown 1996), *Triticum* (Seefeldt *et al.* 1998) y *Helianthus* (Massinga *et al.* 2003), entre otras. También se observaron individuos con resistencia múltiple a imazapir y glifosato en cultivos de canola creciendo en proximidades de plantas IMI resistentes (Hall *et al.* 2000). Sin embargo, la persistencia de estos genes en las generaciones subsiguientes dependerá del modo de herencia y de la aptitud biológica. La aptitud biológica o valor adaptativo es la habilidad relativa de un individuo para sobrevivir y reproducirse en un ambiente dado, donde aquel que tiene mayor aptitud biológica dará mayor descendencia. La misma se mide de

acuerdo a los componentes de supervivencia y fecundidad tales como dormancia, germinación, crecimiento vegetativo, floración, formación de polen y semilla (Jenczewski *et al.* 2003).

La rápida adopción de cultivos transgénicos con caracteres novedosos que afectan la aptitud biológica ha generado inquietudes respecto al potencial aumento de las malezas mediante la hibridación entre cultivos y parientes silvestres (Ellstrand 2003; Pilson y Prendeville 2004, Snow *et al.* 2005). A pesar de que la introgresión de caracteres desde los cultivos puede generar híbridos mal adaptados, con baja aptitud biológica (Stewart *et al.* 2003), los alelos de los genotipos cultivados suelen perdurar en las poblaciones silvestres (Hansen *et al.* 2001; Whitton *et al.* 1997; Snow *et al.* 2001). La introgresión de rasgos transgénicos provenientes de genes simples como son tolerancia a herbicida, resistencia a insecticida y resistencia a enfermedades, pueden llevar a un elevado nivel de aptitud biológica en contraste con los rasgos convencionales del cultivo en poblaciones híbridas (Davis *et al.* 1999; Desplanque *et al.* 2002; Snow *et al.* 2003). Es por ello que es importante el conocimiento de las implicaciones de la aptitud biológica de los genes del cultivo introgresados en las poblaciones silvestres o malezas luego de varias generaciones.

El flujo génico entre las variedades nuevas de girasol cultivado y las especies silvestres podría modificar su estructura poblacional y aptitud biológica. En este capítulo se plantea como objetivo estudiar la transferencia del carácter resistencia a imidazolinonas desde el cultivo de girasol a las poblaciones silvestres y evaluar su efecto sobre la supervivencia y la fecundidad. La modificación de la aptitud biológica de poblaciones de girasol silvestre indicaría un potencial impacto ambiental.

Materiales y Métodos

I- Tolerancia IMI en poblaciones de Helianthus annuus de Argentina:

Se analizaron cinco poblaciones representativas de la región central de Argentina (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Poblaciones estudiadas para evaluar la transferencia del carácter resistencia a herbicida (IMI).

Provincia	Localidad	Número de Colección	Posición geográfica (GPS)
Buenos Aires	Adolfo Alsina	6202	37°16'01" S; 62°59'55" O
Entre Ríos	Diamante	7002	32°03'32" S; 60°38'38" O
La Pampa	Colonia Barón	4802	36°10'37" S; 67°52'34" O
Mendoza	Las Malvinas	2402	34°47'31" S; 68°15'11" O
Córdoba	Río Cuarto	1403	33°09'37" S; 64°20'09" O

Una muestra de semilla de cada una de las cinco poblaciones silvestres se sembró en invernáculo en bandejas plásticas para almácigos con arena y turba (3:1 v/v) con riego diario. A modo de control, se sembraron genotipos cultivados, resistentes y susceptibles a imazapir (DK 3880CL, DK 3820 y DK 4030). Cuando las plantas tenían cuatro hojas se aplicó el herbicida de amplio espectro Imazpir (Clearsol) con el coadyudante Canoplus, en una dosis de 160g /ha de principio activo, el doble de la recomendada comercialmente (Fig. 5.1 a y b). A los 15 días se registró el número de plantas muertas y supervivientes, como así los síntomas de toxicidad en estas últimas (Fig. 5.2 a y b).

II - Cruzamientos de plantas silvestres con un genotipo cultivado IMI-resistente

Se sembraron parcelas alternadas de poblaciones silvestres y el cultivar IMI -resistente DK3880CL, donante de polen. Los cruzamientos se realizaron a mano siguiendo las técnicas convencionales utilizadas en girasol. De cada parcela silvestre, se reunieron los capítulos polinizados con IMI, la semilla F_1 proveniente de ellos se sembró en invernáculo y se aplicó el herbicida en las condiciones descriptas anteriormente. Se registró la supervivencia de plántulas y se comparó con los resultados previos obtenidos de las poblaciones silvestres. Las plantas supervivientes de F_1 fueron trasplantadas al campo experimental y luego retrocruzadas tanto con su parental DK3880CL (R_{1c}) como con plantas de las poblaciones silvestres correspondientes a cada F_1 (R_{1s}). A todas las descendencias se les aplicó el herbicida en las mismas condiciones. Los resultados se evaluaron mediante una prueba de homogeneidad por separado para las distintas regiones de origen, con el fin de identificar alguna respuesta diferencial de acuerdo a la zona de donde provenían las poblaciones silvestres. Asimismo se recogieron capítulos

provenientes de F_1 que habían sido polinizados libremente, de este modo se obtuvo una segunda generación de polinización libre (PL).

III. Análisis de aptitud biológica

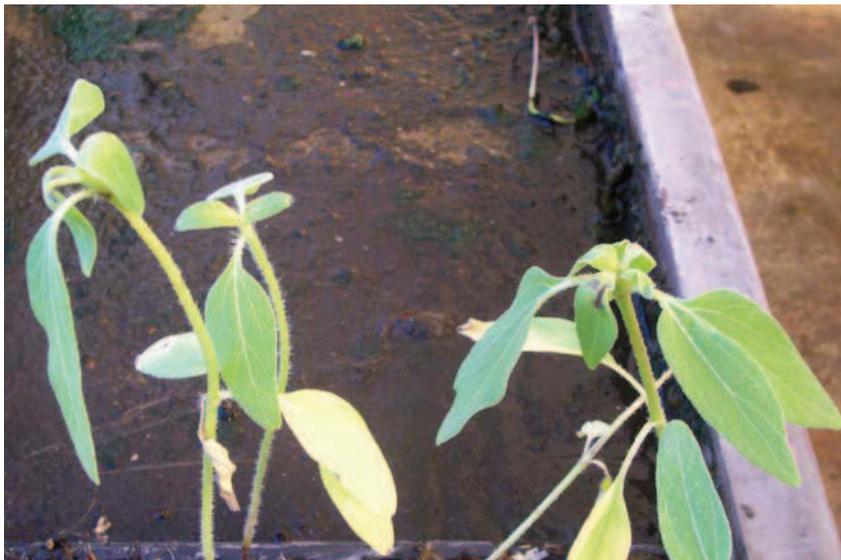
En la campaña siguiente se evaluaron conjuntamente en el campo experimental las cinco poblaciones silvestres y todas las descendencias obtenidas: F_1 , R_{1c} , R_{1s} , y PL. Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado, con tres repeticiones de un máximo de diez plantas cada una. La distancia entre surcos fue de 2,10 m y entre plantas de 0,30 m. Las variables registradas fueron: número y diámetro de capítulos, número de semillas llenas y vanas. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis con el programa InfoStat. Se realizaron correlaciones lineales entre diámetro del capítulo y número de semillas llenas. Las rectas fueron comparadas según Camina y Salomón (2003).

Figura 5.1. Poblacion de girasol silvestre en estadio de cuatro hojas. a) Previo a la aplicación del herbicida b) Plantas supervivientes luego de la aplicación del herbicida.





Figura 5.2. Plantas de girasol silvestre luego de la aplicación del herbicida a) Síntomas de fitotoxicidad: clorosis y muerte de ápice. b) Híbrido DK3880CL y poblaciones silvestres susceptibles.





Resultados

El mayor número de plantas supervivientes en cinco poblaciones de *H. annuus* silvestre y sus descendientes por cruzamiento con una variedad de girasol cultivado resistente a imidazolinonas se encontró en la población de Diamante (Tabla 5.2). Algunas retrocruzas con DK3880CL mostraron 100% de supervivencia, mientras que las retrocruzas con los parentales silvestres también revelaron un aumento en la resistencia.

Tabla 5.2. Supervivencia luego de la aplicación de herbicida en cinco poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* y sus descendencias. P: población pura, F₁: primera generación de cruzamiento con genotipo cultivado resistente, R₁: retrocruzas con plantas silvestres (s) y genotipo cultivado (c)

Poblaciones	Plantas vivas	Plantas muertas	N	Supervivencia %
Río Cuarto P	1	70	71	1,4
Río Cuarto F ₁	21	20	41	51,2
Río Cuarto R ₁ c	58	2	60	96
Río Cuarto R ₁ s	48	12	60	80
Colonia Barón P	1	66	67	1,5
Colonia Barón F ₁	8	36	44	18,2
Colonia Barón R ₁ c	60	0	60	100
Colonia Barón R ₁ s	49	9	58	84,5
Diamante P	3	66	69	4,3
Diamante F ₁	34	32	66	51,5
Diamante R ₁ c	56	0	56	100
Diamante R ₁ s	55	5	60	92
Las Malvinas P	1	39	40	2,5
Las Malvinas F ₁	28	43	71	39,4
Las Malvinas R ₁ c	60	0	60	100
Las Malvinas R ₁ s	43	17	60	71,6
Adolfo Alsina P	0	54	54	0
Adolfo Alsina F ₁	41	87	128	32
Adolfo Alsina R ₁ c	54	4	58	93,1
Adolfo Alsina R ₁ s	43	11	54	79,6

En las poblaciones silvestres se registró un promedio de 2% de sobrevivientes espontáneas en 301 plantas evaluadas, mientras que la supervivencia de F_1 aumentó 38% sobre un total de 350 plantas. Asimismo, al retrocruzar estos individuos con los genotipos que le dieron origen hubo un aumento significativo en el porcentaje de supervivencia (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Individuos sobrevivientes a la aplicación de Imazapir por categoría, como promedios de cinco poblaciones silvestres.

Categoría	Sobrevivientes	Total	Supervivencia (%)
Poblaciones silvestres	6	301	2
Poblaciones X DK 3880 CL (F_1)	132	350	38
Retrocruzas con DK 3880 CL (R_{1c})	288	294	98
Retrocruzas con silvestre (R_{1s})	238	292	81

Al analizar por separado las categorías considerando su procedencia, no se observaron diferencias significativas en el número de plantas supervivientes entre las poblaciones silvestres puras ni en las retrocruzas con las mismas, R_{1s} . No obstante, se obtuvo una respuesta diferencial tanto en las F_1 como en la retrocruza con el genotipo cultivado, R_{1c} (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Diferencias en el número de plantas silvestres supervivientes por categoría y por sitio de recolección. Por encima de la diagonal se encuentran las F_1 , por debajo las R_{1c} . Diferencias significativas para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y no significativas (ns).

	Río Cuarto	Diamante	Las Malvinas	Adolfo Alsina	Colonia Barón
Río Cuarto		ns	ns	ns	**
Diamante	ns		ns	**	**
Las Malvinas	ns	ns		ns	*
Adolfo Alsina	ns	*	*		ns
Colonia Barón	ns	ns	ns	*	

La prueba de homogeneidad mostró que todas las categorías se diferenciaron de sus progenitores silvestres y entre sí, en la respuesta a la pulverización con Imazapir ($p < 0.001$). Los testigos cultivados no resistentes (DK 3820 y DK 4030) presentaron en su mayoría daños graves y no hubo ninguna planta sin daño.

En el estudio de aptitud biológica se observó que las plantas silvestres de las cinco poblaciones se diferenciaron de las F_1 por tener mayor número de capítulos (Tabla 5.5). Si bien, las poblaciones silvestres tuvieron en general un menor tamaño de capítulo, en algunos casos esta diferencia no fue significativa en comparación con el resto de las generaciones. El número de semillas llenas se redujo significativamente en las F_1 , no obstante este rasgo se recuperó en las siguientes generaciones. En tanto, el porcentaje de semillas cuajadas disminuyó en la primera generación de cruzamiento (F_1) en todas las poblaciones analizadas, mostrando asimismo una recuperación en las generaciones subsiguientes.

Tabla 5.5. Caracteres reproductivos de las poblaciones de *H. annuus* silvestre y sus respectivas F₁, R_{1c}, R_{1s} y PL por cruzamiento con el híbrido comercial IMI resistente DK 3880CL. Medias seguidas de distinta letra indican diferencias altamente significativas (p<0,01) luego de la prueba de Kruskal-Wallis.

Población	Semillas llenas (n)	Diámetro de capítulo (cm)	Semillas cuajadas (%)	Capítulos (n)
Las Malvinas P	262,31 bc	4,73 a	84,17 bc	96,44 c
Las Malvinas F ₁	23,59 a	4,99 ab	60,96 a	46,31 c
Las Malvinas PL	254,01 bc	5,30 ab	87,57 cd	25,85 b
Las Malvinas R _{1c}	220,00 b	6,47 b	72,20 b	9,63 a
Las Malvinas R _{1s}	317,19 c	7,76 c	89,73 d	20,81 ab
Río Cuarto P	186,59 bc	3,98 b	84,64 b	112 c
Río Cuarto F ₁	33,67 a	6,40 d	64,27 a	48,58 b
Río Cuarto PL	73,17 a	3,15 a	47,28 a	47,15 b
Río Cuarto R _{1c}	193,41 b	6,17 c	63,42 a	7,92 a
Río Cuarto R _{1s}	216,53 c	6,31 d	87,27 b	43 bc
Colonia Barón P	200,00 b	4,14 a	85,58 b	85 b
Colonia Barón F ₁	35,04 a	6,17 b	72,05 a	25,90 a
Colonia Barón PL	222,92 b	5,33 b	64,78 a	30,38 a
Colonia Barón R _{1c}	263,64 b	7,29 b	91,32 b	18,86 a
Colonia Barón R _{1s}	120 ab	5,25 ab	85,70 ab	30,00 ab
Diamante P	190,77 c	3,92 a	83,98 c	85,00 c
Diamante F ₁	31,94 a	5,64 b	65,13 b	14,18 a
Diamante PL	320,76 c	6,79 b	80,16 bc	24,18 b
Diamante R _{1c}	107,56 b	4,58 a	54,47 a	12,06 a
Diamante R _{1s}	202,37 c	6,09 b	78,48 bc	20,38 ab
Adolfo Alsina P	199,00 b	4,39 a	82,50 b	103,62 c
Adolfo Alsina F ₁	20,48 a	4,81 ab	60,98 a	16,00 a
Adolfo Alsina PL	192,71 b	5,78 bc	77,41 b	35,67 b
Adolfo Alsina R _{1c}	226,52 b	6,06 bc	74,18 b	11,69 a
Adolfo Alsina R _{1s}	208,46 b	6,64 c	80,73 b	22,14 a

Al agrupar las poblaciones por categoría, el número promedio de semillas llenas por capítulo disminuyó significativamente en la primera generación de cruzamiento (F₁),

no obstante aumentó en la siguiente generación obtenida por retrocruzas o en condiciones de polinización libre (Tabla 5.6). El carácter diámetro del capítulo aumentó significativamente luego del cruzamiento con DK3880CL y ese efecto perduró en las siguientes generaciones de cruzamiento. El porcentaje de semilla cuajada también disminuyó significativamente en F_1 , sin embargo se recuperó en las generaciones siguientes hasta alcanzar valores que no diferían significativamente de la población inicial. El número de capítulos fue significativamente mayor en las poblaciones silvestres puras que en las generaciones que habían sido cruzadas al menos una vez con el genotipo cultivado. Se realizó una estimación del número de semillas totales en cada una de las categorías mediante la multiplicación del número de semillas llenas por capítulo y el número de capítulos por planta. El número de semillas totales fue mayor en las poblaciones silvestres, disminuyó drásticamente en la generación F_1 y se recuperó en las generaciones sucesivas. A pesar de la tendencia observada al aumentar el número de semillas luego de las retrocruzas, esos valores no alcanzaron a la mitad del número de semilla obtenida en las poblaciones silvestres puras.

Tabla 5.6. Número de semillas llenas, diámetro del capítulo (cm), % de semillas y número de capítulos por planta en poblaciones de *Helianthus annuus* y sus cruzamientos. Medias seguidas de distinta letra indican diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) luego de la prueba de Kruskal-Wallis.

Categoría	Semillas llenas/capítulo (n)	Diámetro de capítulo (cm)	Semillas cuajadas (%)	Capítulos (n)	Semillas llenas (n) Total estimado
Población	207,5 cd	4,2 a	84,2 c	95,3 d	19776
F_1	28,9 a	5,6 c	64,8 a	25,8 b	745
PL	212,4 bc	5,2 b	71,1 b	32,4 c	6882
R_{1c}	193,5 b	5,9 bc	68,8 b	11,3 a	2186
R_{1s}	236,4 d	6,7 d	83,7 c	23,8 b	5626

La regresión del número de semillas llenas sobre el diámetro de capítulo agrupando las poblaciones y sus híbridos mostró que la relación fue mucho mayor en las poblaciones puras. En las F_1 el aumento en diámetro del capítulo no fue acompañado de mayor número de semillas llenas (Fig. 5.3). No se observaron diferencias en la relación diámetro de capítulo/número de semillas llenas entre ambos tipos de retrocruzas (Fig. 5.4). Las rectas se solaparon demostrando que el aumento del diámetro de capítulo permitió un

mayor número de semillas llenas en ambas generaciones retrocruzadas. Asimismo la retrocruza con el parental cultivado IMI (R_{1c}) y con las poblaciones silvestres (R_{1s}) aumentó el número de semillas llenas con respecto a la F_1 (Fig. 5.5).

Figura 5.3. Regresión del número de semillas y el diámetro del capítulo en plantas silvestres de *H. annuus* (símbolos negros) y F_1 del cruzamiento con un híbrido comercial IMI resistente (símbolos grises).

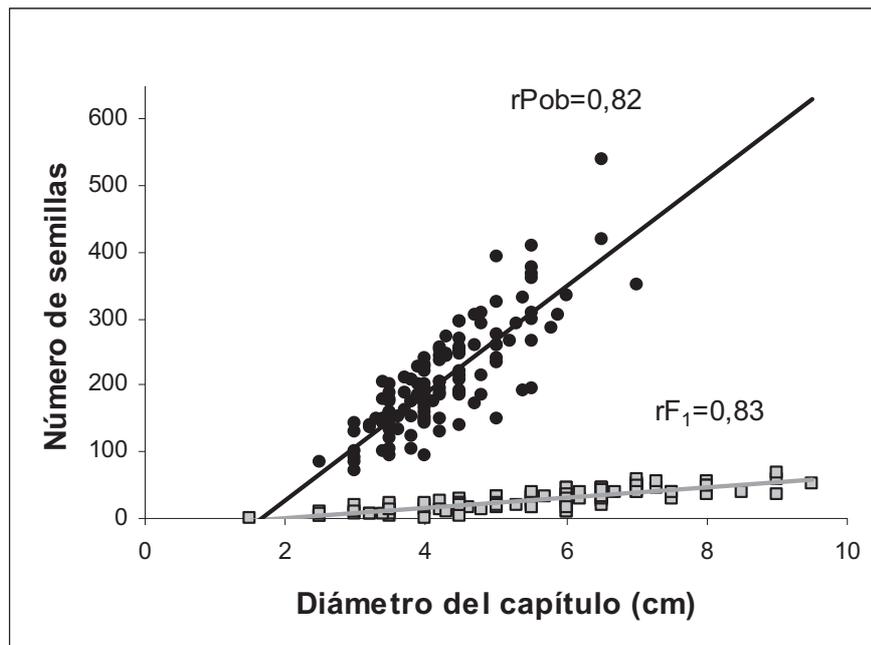


Figura 5.4. Regresión del número de semillas y el diámetro del capítulo en retrucruzas con ambos padres, cultivado (R_{1c} , símbolos negros) y silvestre. (R_{1s} , símbolos grises).

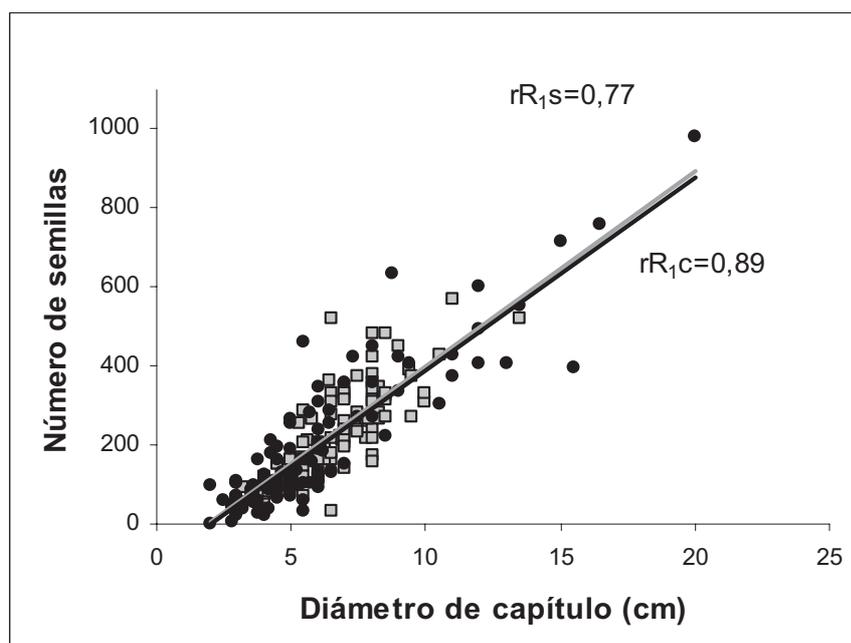
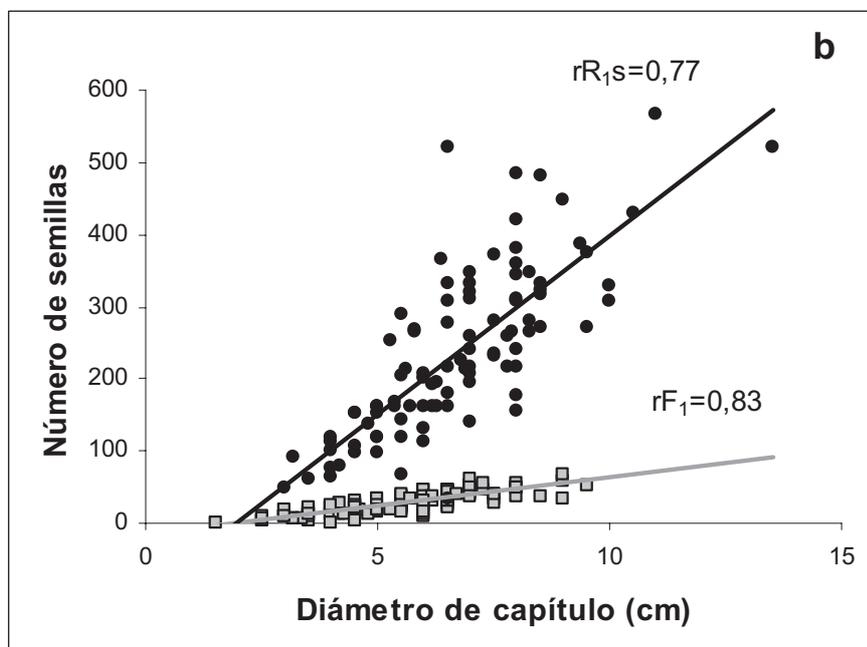
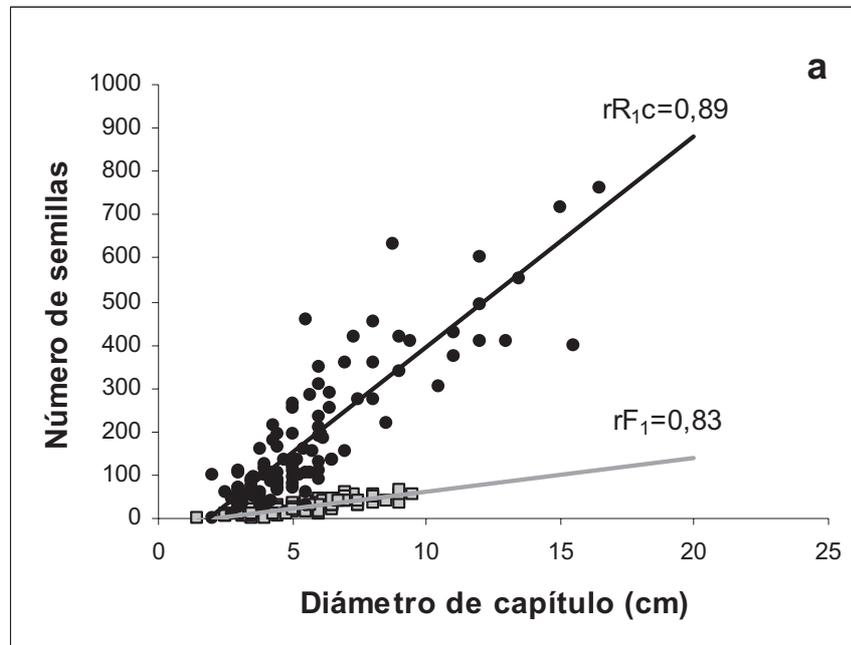


Figura 5.5. Recuperación del número de semillas por capítulo por retrocruza con respecto a F_1 . a) Retrocruza con el parental cultivado, R_{1c} (símbolos negros) y F_1 (símbolos grises). b) Retrocruza con el parental silvestre, R_{1s} (símbolos negros) y F_1 (símbolos grises).



Discusión

Los cultivos resistentes a herbicidas han sido comercializados desde el año 1984, cuando se introdujo en Canadá la primera colza resistente a Triazina. La misma se había desarrollado mediante métodos tradicionales de mejoramiento, donde la resistencia se transfirió por retrocruzamientos entre *Brassica rapa* y una variedad comercial de colza (Hall *et al.* 1996). La posibilidad de dispersión de genes de resistencia a herbicida sería considerada un problema para la agricultura sustentable ya que podría conducir a poblaciones de malezas y voluntarios tolerantes a uno o varios tipos de herbicidas, transformando el control de malezas en una labor dificultosa (Hall *et al.* 2000). La transferencia de genes de resistencia a herbicida desde los cultivos a especies silvestres o malezas emparentadas puede ocurrir directamente y originar biotipos silvestres más nocivos y de difícil control, como sucedió en los géneros *Brassica* (Brown y Brown 1996) y *Oryza* (Kumar *et al.* 2008), o bien a través de los voluntarios que permanecen de una campaña a la siguiente de cultivo y forman poblaciones ferales resistentes a herbicida (Kawata *et al.* 2009). Una vez que el gen de resistencia está presente en plantas espontáneas o en especies emparentadas se espera que las mismas prácticas de control de malezas lleven a un rápido aumento de las malezas y plantas espontáneas resistentes a herbicidas. No obstante, el destino final de los alelos domesticados que migran hacia las poblaciones silvestres depende de la aptitud biológica que los mismos le confieran (Ellstrand, 2003). La tolerancia a imidazolinonas sería de fácil transferencia a las poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* debido a la estrecha relación genética, geográfica, y a la coincidencia en el período de floración con el girasol cultivado. El bajo número de individuos resistentes hallado en las poblaciones silvestres indicaría que esta característica no se encuentra aún muy difundida en Argentina. Sin embargo, los valores encontrados luego de una primera generación de cruzamiento con el cultivo resistente revelan que la resistencia al herbicida podría difundirse rápidamente en las poblaciones silvestres en contacto con las variedades IMI-resistentes. Mas aún, teniendo en cuenta que en la última campaña de girasol el uso de híbridos resistentes a imidazolinonas llegó a duplicar la campaña precedente, alcanzando un valor cercano al 10% de la superficie implantada. El mayor incremento en el uso de híbridos resistentes fue en la provincia de Córdoba, donde pasó de 6,8% en la campaña 2007/2008 a 35,2% en la campaña siguiente. Luego se ubicó la provincia de Buenos Aires, con un 14,1% de superficie utilizando materiales resistentes a imidazolinonas (MAGyP 2009). La rápida adopción de esta tecnología se podría explicar en parte por su origen natural (no-GM) debido que proviene de una mutación en una población silvestre de girasol, seleccionada por la aplicación de herbicida durante siete años consecutivos (Al-Khatib *et al.* 1998). La

posibilidad de transferencia, la posterior perdurabilidad y la modificación que estas características tengan sobre las poblaciones silvestres naturalizadas es similar a la que produciría cualquier otro rasgo obtenido con herramientas de ingeniería genética. Los efectos ecológicos de los cultivos transgénicos y del escape de transgenes a poblaciones silvestres han sido objeto de varias revisiones (Dale *et al.* 2002, Ellstrand 2003, Pilson y Prendeville 2004). Sin embargo, no se han tomado las mismas precauciones con los caracteres adquiridos por cruzamiento convencional, que podrían modificar igualmente la estructura y el comportamiento de las poblaciones silvestres. En este estudio se logró determinar que la presencia del carácter IMI-resistente aumentó significativamente en la F_1 , pero a su vez se observó una gran disminución en el número de semilla viable. Estudios previos realizados sobre *Helianthus* demostraron que los híbridos obtenidos entre el cultivo y las poblaciones silvestres tenían menor fecundidad que sus contrapartes silvestres (Snow *et al.* 1998, Cummings *et al.* 2002). Este efecto podría disminuir la transferencia de la resistencia a herbicida a las generaciones siguientes. La aptitud biológica de los híbridos F_1 no determina la introgresión final de los alelos cultivados, pero afecta su curso inicial a través del efecto sobre los alelos cultivados que posteriormente estarán sujetos a selección y deriva (Mercer *et al.* 2006).

El presente estudio comprobó que las retrocruzas en ambos sentidos lograron una elevada tolerancia en todas las poblaciones estudiadas y que el número de semillas llenas aumentó significativamente. Asimismo, la similitud de los resultados hallados para las retrocruzas con ambos parentales indicaría una tendencia a la estabilidad del carácter en las generaciones subsiguientes. Esto podría deberse al modo de herencia de este carácter, que estaría gobernado por dos genes (Hall *et al.* 2000, Burniard y Miller 2001) y la presencia de ambos estabilizaría el rasgo en las generaciones avanzadas

El número de capítulos por planta no se recuperó mediante polinización libre valores semejantes a los de la población silvestre, lo que podría explicarse teniendo en cuenta que es un rasgo asociado a la ramificación. La herencia del carácter ramificación es compleja con dos tipos de genes controlando dicha característica (Miller y Fick 1997). En las especies silvestres este carácter está generalmente controlado por genes dominantes, mientras que en las líneas restauradoras utilizadas para crear híbridos es recesivo. Según lo observado, una vez que las poblaciones silvestres se cruzan con el cultivo, el número de ramificaciones disminuye y con él, el número de capítulos por planta haciendo dificultoso el retorno a la situación inicial. Estos resultados son similares a los encontrados por Luczkiewicz (1975). El número total de semillas por planta fue superior en las poblaciones silvestres, no obstante, el carácter se recuperó parcialmente tanto en las poblaciones de polinización libre como en ambas retrocruzas. Debido a la pronta recuperación en los parámetros de fertilidad observada en las generaciones posteriores al

cruzamiento inicial con la variedad cultivada resistente, se puede afirmar que el carácter IMI difundirá rápidamente en la población silvestre aunque los individuos F_1 tengan una menor aptitud biológica.

La introducción de híbridos IMI- resistentes proveyó una herramienta de gran utilidad para el control de malezas en girasol. La probabilidad de que la resistencia a esos herbicidas se difunda en las poblaciones silvestres de Argentina es elevada debido a que los genotipos susceptibles y resistentes se cruzan entre sí con facilidad. Asimismo, los biotipos resistentes a los herbicidas de los cultivos y las malezas pueden tener capacidades competitivas similares a los no resistentes en ausencia del herbicida (Metz *et al.* 1998). La transferencia del carácter IMI a las poblaciones silvestres podría evitarse si se complementara con estrategias convencionales de control de malezas como son la rotación de cultivos, rotación de herbicidas con distintos modos de acción y control mecánico de malezas (Matthews 1994).

CONSIDERACIONES FINALES

Las especies silvestres de girasol, *H. a. annuus* y *H. petiolaris*, se encuentran ampliamente difundidas en el área del cultivo en Argentina. Ambas poseen la capacidad de adaptación a distintos tipos de suelos y climas, características que serían transferibles al cultivo que actualmente ha sido desplazado hacia nuevas áreas. La variabilidad genética de las especies silvestres locales es comparable a la de su centro de origen y debería ser preservada para su utilización en el mejoramiento del cultivo. Actualmente mi equipo de trabajo se encuentra llevando adelante estudios de resistencia a factores adversos bióticos y abióticos en estas especies silvestres.

En este estudio se comprobó que el flujo génico entre el girasol y las especies silvestres emparentadas ocurre en toda el área de distribución del cultivo y que la fertilidad de los híbridos cultivo- silvestre se recupera en unas pocas generaciones de retrocruza con ambos parentales.

Siendo Argentina el principal exportador de aceite de girasol en el mundo, deberían plantearse estrategias a largo plazo, con el fin de mantener el cultivo en su capacidad máxima de rendimiento por superficie. Dada la incorporación de zonas más marginales para el cultivo de girasol, el germoplasma silvestre podría ser una alternativa para la adaptación y la mejora en el rendimiento. Asimismo, debido al flujo existente entre el cultivo y las especies emparentadas, deberían plantearse manejos integrados que incluyan rotación de cultivos y herbicidas, para lograr un uso prolongado de tecnologías emergentes, como lo es actualmente la resistencia a herbicidas de la familia imidazolinonas.

Los estudios de flujo génico entre los cultivos y sus parientes silvestres deben ser realizados caso por caso. En base a la experiencia del presente, junto con mi equipo de trabajo, hemos comenzado un estudio similar en el cultivo de colza y sus especies silvestres emparentadas.

REFERENCIAS

- Afif M., Benfadhl N., Khouja M.L., Boussaid M. 2006 Genetic diversity in Tunisian *Ceratonia siliqua* L. (Cesalpinioideae) natural populations. *Genet Res Crop Evol* 53: 1501–1511
- Ahl Goy P., Duesing J.H. 1996 Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Biotechnology* 14: 39-40
- Alexander M.P. 1980 A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. *Stain Technol* 55:13–18
- 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
- Anderson E., Stebbins G.L. 1954 Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378–388
- ARGENBIO <http://www.argenbio.com.ar>
- Arias D.M, Rieseberg L.H. 1994 Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theor Appl Genet* 89: 665-660
- Arias D.M., Rieseberg L.H. 1995 Genetic relationships among domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Econ Bot* 49: 239-248
- Arriola P.E., Ellstrand N.C. 1997 Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: persistence of crop genes in the wild populations. *Ecol Appl* 7: 512–518
- BASF 2003 CLEARFIELD Hybrids with no GMO Traits. <http://www.clearfieldssystem.com/html/gmo.html>.
- Bauer H.A. 1991 Cuarenta años en el mejoramiento de Girasol (*Helianthus annuus* L) en Argentina. *Helia* 14: 63-68
- Baumgartner J.R., Al-Khatib K., Currie R.S. 1999a Cross-resistance of imazethapyr-resistant common sunflower (*Helianthus annuus*) to selected imidazolinone, sulfonylurea, and triazolopyrimidine herbicides. *Weed Technol.* 13: 489-493.
- Baumgartner J.R., Al Khatib K., Currie R.S., 1999b Survey of common sunflower (*Helianthus annuus*) resistance to imazethapyr and chlorimuron in northeast Kansas. *Weed Technol* 13: 510-514
- Bervillé A., Muller M.H., Poinso B., Serieys H. 2005 Fertility Risks of gene flow between sunflower and other *Helianthus* species In: Gressel J (ed.) *Crop Fertility and Volunteerism*, CRC Press, Boca Ratón, USA pp 209-230
- Bertero de Romano A., Vazquez A.N. 2003 Origin of the sunflower varieties. *Helia* 26: 127-136.
- Briggs D., Walter S.M. 1997 *Plant Variation and Evolution*. Cambridge University press. UK

- Brown A.H.D. 1978 Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor Appl Genet* 52: 145-157.
- Brown J., Brown A.P. 1996 Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) and related weed species. *Ann Appl Biol* 129: 513–522
- Bruniard J.M., Miller J.F. 2001 Inheritance of imidazolinone herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24:11–16
- Burke J.M., Rieseberg L.H. 2003 Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300:1250
- Burke J.M., Gardner K.A., Rieseberg L.H. 2002a. 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. 2002b. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257–1267
- Burke J.M., Lai Z., Salmaso M., Nakazato T., Tang S.X., Heesacker A., Knapp S.J., Rieseberg L.H. 2004 Comparative mapping and rapid karyotypic evolution in the genus *Helianthus*. *Genetics* 167: 449–457
- Cabrera A.L. 1963 Flora de la Provincia de Buenos Aires, Parte VI: Compuestas. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.
- Cabrera A.L. 1974 Compositae En: Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina).Parte IV. Colección Científica del INTA, por A Buckart (Dir.) Buenos Aires
- Cabrera A.L. 1978 Flora de la Provincia de Jujuy, Parte X: Compositae. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.
- Cantamutto MA, Ureta, MS, Gutierrez A, Presotto AD, Poverene MM. 2007 Zonas híbridas entre especies silvestres de *Helianthus* en Argentina.. *Basic Appl Gen* 18(II): 192.
- Cantamutto M., Poverene M., Peinemann N. 2008. Multi-scale analysis of two annual *Helianthus* species naturalization in Argentina. *Agric Ecosys Envir* 123: 69-74
- Cantamutto M., Torres L., Presotto A, Gutiérrez A, Ureta S., Poverene M. 2009. Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual *Helianthus* populations in central Argentina. *Biol Invas* DOI 10.1007/s10530-009-9458-8
- Camina R., Salomon R. 2003 Plantilla de c culo de Microsoft Excel 97 programada por el Departamento de Matemática. Universidad Nacional del Sur.
- Carrera A.D. 2001 Marcadores isoenzimáticos en germoplasma de girasol. Tesis Doctoral. UNS. pp.118.
- Carrera A., Poverene M. 1995 Isozyme variation in *Helianthus petiolaris* and sunflower, *H. annuus*. *Euphytica* 81: 251-257
- Carrera A.; Poverene M.; Rodríguez R. 1996 Isozyme variability in *Helianthus argophyllus*. Its application in crosses with cultivated sunflower. *Helia* 19: 19-28

- Carrera A, Pizarro G, Poverene M, Feingold S, Berry S, León A. 2002 Variability among inbred lines and RFLP mapping of sunflower isozymes. *Gen Mol Biol* 25: 65-72
- Cialzeta C., Antonelli E. 1971 Especies silvestres del género *Helianthus* como fuentes de resistencia a algunas enfermedades de girasol. Instituto Agroindustrial de Oleaginosos (ed.) Buenos Aires, Actas 11-18
- Ciencia y Técnica Agropecuaria 2003 Reglamentaciones oficiales argentinas para el control de calidad, muestreo, metodología, análisis y comercialización de cereales, oleaginosos y subproductos. D.J. Durand (ed.), Buenos Aires, 250 pp
- CONABIA 2009 Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agrícola. <http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/areas/biotecnologia/30-marcoregulatorio/archivo/MarcoRegulat>
- Conner A.J., Travis R.G., Nap J.P. 2003 The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J* 33: 19–46
- Covas G. 1966 Antófitas nuevas para la flora pampeana. *Apuntes para la Flora de La Pampa* 22: 88
- Covas G. 1984 Algunas plantas que en el último cuarto de siglo se han transformado de adventicias en naturalizadas y notablemente expandidas en la provincia de La Pampa. *Apuntes para la Flora de La Pampa* 83: 330-332
- Covas G., Vargas López J.L. 1970 Híbridos naturales de *Helianthus petiolaris* x *Helianthus annuus*. *Apuntes para la Flora de La Pampa* 46: 181-182
- Cronn R., Brothers M., Klier K., Bretting P.K., Wendel J.F..1997 Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor Appl Genet* 95: 532-545
- Cummings C.L., Alexander H.M., Snow A.A., Rieseberg L.H., Kim M.J., Culley T. M. 2002 Fecundity selection in a sunflower crop-wild study: Can ecological data predict crop allele changes? *Ecol Appl* 12: 1661–1671
- Dale P.J. 1994 The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: General considerations. *Mol Ecol* 3: 31-36
- Davis S.A., Catchpole E.A. , Pech R.P. 1999 Models for the introgression of a transgene into a wild population within a stochastic environment, with applications to pest control. *Ecol Modell* 119: 267–275
- de la Vega A.J., DeLacy I.H., Chapman S.C. 2007 Progress over 20 years of sunflower breeding in central Argentina. *Field Crops Res* 100: 61–72
- Desplanque B., Hautekeete N., Van Dijk H. 2002 Transgenic weed beets: possible, probable, avoidable? *J Appl Ecol* 39: 561– 571
- Devine M.D., Duke S.O., Fedtke C. 1993 *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 441pp

- De Woody J., Rickman T.H., Jones, B.E., Hipkins, V.D. 2009 Allozyme and microsatellite data reveal small clone size and high genetic diversity in aspen in the southern Cascade Mountains. *Forest Ecol Manage* 258: 687-696
- 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
- Dorado O., Rieseberg L.H., Arias D. 1992 Chloroplast DNA introgression in southern California sunflowers. *Evolution* 46: 566-572
- Dry P.J., Burdon J.J. 1986 Genetic structure of natural populations of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.* 39: 255-270.
- Duggleby R.G. Pang S.S. 2000 Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Mol Biol* 33(1): 1-36.
- Ellstrand N.C. 2003 *Dangerous Liasons? When cultivated plants mate with their wild relatives.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 244p.
- Ellstrand N.C., Schierenbeck K.A. 2000 Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97: 7043-7050.
- 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.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ferreira V. 1980 Hibridación e introgresión entre *Helianthus annuus* L. y *Helianthus petiolaris* Nutt. *Mendeliana* 4: 81-93.
- Ferreira V. 1985. Variabilidad y citogenética de los híbridos entre tres especies de *Helianthus*. *Mendeliana* 7: 13-30.
- Ferreira V., L. Reinoso, B. Szpiniak 1988 Híbridos interespecíficos de *Helianthus*. Efecto citogenético y agronómico de las cruces con girasol. *Proc. XII Intl. Sunflower Conf.*, Novi Sad, Yugoslavia: 271-276.
- Futterer J., Gisel A., Iglesias V., Klöti A., Kost B., Mittelsen Scheid O., Neuhaus – Url G., Schrott M., Shillito R., Spangenberg G., Wang Z.Y. 1995 Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants. En: *Gene transfer to plants.* Potrykus I, Spangenberg G (eds), Springer Lab Manual, capítulo 25: 215.
- González Roelants G., Vicien C., Gherza C., León A. 1997 El girasol en la República Argentina. Influencia de las especies silvestres. Informe preparado para la CONABIA, 21p.
- Gower J.C. 1975 Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33-51.
- Gressel J., Segel L.A. 1978 The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. *J Theor Biol* 75:349-371.

- Gross, B.L., Kane N.C., Lexer C., Ludwig F., Rosenthal D.M., Donovan L.A., Rieseberg L. H. 2004 Reconstructing the origin of *Helianthus deserticola*: survival and selection on the desert floor. *Am Nat* 164:145–156.
- Hails R.S., Morley K. 2005 Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends Ecol Evol* 20: 245-262.
- Hall J.C., Donnelly-Vanderloo M.J., Hume D.J. 1996 Triazine-resistant crops: The agronomic impact and physiological consequences of chloroplast mutation. En Duke, S.O.ed., *Herbicide-resistant crops. Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and technical aspects*. USA, CRC Press. : 107-126.
- Hall L., Topinka K., Huffman J., Davis L., Good A. 2000 Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. *Weed Sci* 48: 688–694.
- Hansen L.B., Siegismund H.R., Jørgensen R.B. 2001 Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative. *Gen Res Crop Evol* 48: 621–627.
- Hamrick J.L. 1982 Plant population genetics and evolution. *Am J Bot* 69: 1685-1693.
- Hamrick J.L., Godt M.J. 1990 Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Heap I. 2003 International survey of herbicide resistant weeds.<http://www.weedscience.org>
- Heiser C.B. Jr 1947 Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Evolution* 1: 249-262.
- Heiser C.B. Jr. 1954 Variation and subspeciation in the common sunflower, *Helianthus annuus*. *The American Midland Naturalist*, 51: 287-305.
- Heiser C.B. Jr. 1961 Morphological and cytological variation in *Helianthus petiolaris* with notes on related species. *Evolution* 15: 247-258
- Heiser C.B. Jr. 1976 *The Sunflower*. Univ. of Oklahoma Press, Norman, 198 p.
- Heiser C.B. Jr 1978 Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. En: J.F. Carter (Ed.) *Sunflower Science and Technology*, Agronomy series 19, Am. Soc. of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin: 31-53.
- Heiser C.B. Jr., Smith D.M., Clevenger S.B., Martin Jr. W.C. 1969 The North American Sunflowers (*Helianthus*) *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 22: 1-37.
- Hooftman D.A., Oostermeijer J.G., Jacobs, M., Den Nijs H.C 2005 Demographic vital rates determine the performance advantage of crop–wild hybrids in lettuce. *J Appl Ecol*, 42: 1086-1095
- InfoStat 2006. InfoStat versión 2006. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

- Jan CC, Seiler GJ. 2007 Sunflower. In: Singh RJ (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Oilseed crops (Vol. 4). CRC Press, Boca Raton, pp 103–165
- Jander G., Baerson S.R., Hudak J.A., Gonzalez K.A., Gruys K.J., Last R. 2003 Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol* 131:139–146.
- Jenczewski E., Ronfort J., Chevre A.M. 2003 Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environ Biosafety Res* 2: 9–24
- Kahler A.L., Lay C.L. 1985 Genetics of electrophoretic variants in the annual sunflower. *J Heredity* 76: 335-340.
- 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
- 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.
- Kinman, M.L. 1970 New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. In: Proceedings of 4th International Sunflower Conference, vol. 4, Memphis, TN : 181–183.
- Keeler K.H. 1989 Can genetically engineered crops become weeds? *Biotechnology* 7: 1134-1139.
- Keeler, K.H., Turner C.E. 1990 Management of transgenic plants in the environment. In M. Levin and H. Strauss, editors. Risk assessment in genetic engineering: environmental release of organisms. McGraw- Hill, New York, New York, USA. : pp 189–281.
- Kumar V., Bellinder R.R., Brainard D.C., Malik R.K., Gupta R.K. 2008 Risks of herbicide-resistant rice in India: A review. *Crop Protection* 27: 320–329.
- Lai, Z., Nakazato T., Salmaso M., Burke J.M., Tang S.X., Knapp S.J., Rieseberg L.H. 2005 Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. *Genetics* 171: 291–303.
- Leclercq, P. 1969 Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plantes* 19: 99–106.
- Lexer C., Welch M.E., Raymond O., Rieseberg L.H. 2003 The origin of ecological divergence in *Helianthus paradoxus* (Asteraceae): selection on transgressive characters in a novel hybrid habitat. *Evolution* 57: 1989-2000.
- Lexer C.M., Fay F., Joseph J.A., Nica M.S., Heinze B. 2005 Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula*

- (European aspen): The role of ecology and life history in gene introgression. *Mol Ecol* 14: 1045–1057.
- Linder C.R., Taha I., Seiler G.J., Snow A.A., Rieseberg L.H. 1998 Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theor Appl Genet* 96: 339-347.
- Luczkiewicz T. 1975 Inheritance of some characters and properties in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genet Pol* 16: 167–184.
- 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.
- Marshall M., Al-Khatib K., Loughin T. 2001 Gene flow, growth, and competitiveness of imazethapyr-resistant common sunflower. *Weed Sci.* 49: 14-21.
- Martinsen G.D., Whitham T.G., Turek R.J., Keim P. 2001 Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* 55: 1325–1335.
- Matthews J.M. 1994 Management of herbicide resistant weed populations. *in* S. B. Powels and J.A.M Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 317-335.
- Mercer K.L., Wyse D. L., Shaw, R.G. 2006 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.
- Metz P.L.J., Stiekema W.J., Nap J.P. 1998 A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricintolerant plants. *Mol Breed* 4: 335–341.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). <http://www.minagri.gov.ar>
- Miller J.F., Fick G.N. 1997 The genetics of sunflower. *In* AA Schneiter (ed.) *Sunflower Technology and Production*, Agronomy series 35, Am Soc Agron, Inc., Madison, Wisconsin, pp 441-495.
- Morikawa T., Leggett J.M. 2008 Isozyme polymorphism and genetic differentiation in natural populations of an endemic tetraploid species *Avena maroccana* in Morocco. *Gen Res and Crop Evol* 55(8): 1313-1321.
- Nei, M. 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3321-3.
- Nikolova L., Christov M., Nikolova V., Shindrova P., Encheva V. 1998 Interspecific hybridization between *H. annuus* L. and *H. praecox* spp. *hirtus* Engelman and Gray. *Helia* 21: 15-22.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peakall R., Smouse P.E., Huff D.R. 1995 Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm). *Mol Ecol* 4: 135–147.

- Perfectti F., Pascual L. 2004 Geographic variation for isozymes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) *Gen Res Crop Evol* 51: 837-843.
- Pilson D., Prendeville H.R. 2004 Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annu Rev Ecol Syst* 35: 149–174.
- Pizarro G., Carrera A., Poverene M., Rodríguez R., Echeverría M., Salaberry M. 2000 Comparative analysis of genetic relationships in sunflower inbred lines, based on isozymic, RAPD and pedigree data. 15th. International Sunflower Conference, Toulouse, Francia, 12-15 junio 2000. Proceedings Tome II E-111-116.
- Poverene M., Cantamutto M.A., Carrera A.D., Ureta M.S., Salaverry M.T., Echeverría M., Rodríguez R.H. 2002 El girasol silvestre (*Helianthus* spp.) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias RIA* 31: 97–116.
- 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
- Presotto A. 2004 Caracterización morfológica y fenológica de poblaciones argentinas de girasol silvestre (*Helianthus annuus annuus* L.) Trabajo Final de Carrera de Ingeniería Agronómica, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 41p.
- Presotto A., Cantamutto M, Poverene M, Seiler G.2009 Phenotypic diversity in wild *Helianthus annuus* from Argentina. *Helia* 32: 37-50.
- Quillet M.C., Vear F., Branlard G. 1992 The use of isozyme polymorphism for identification of sunflower (*Helianthus annuus*) inbred lines. *J Genet Breed* 46: 795-804.
- Quillet M.C., Madjidian N., Griveau Y., Serieys H., Tersac M., Lorieux M., Bervillé A. 1995 Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor Appl Genet* 91: 1195-1202.
- Radosevich, S.R., Holt, J.S., Ghersa, C., 1997 Weed demography and population dynamics. In: *Weed Ecology: Implications for Management*, second ed. Wiley, New York, pp. 103–162
- Reagon M., Snow A.A. 2006 Cultivated *Helianthus annuus* (Asteraceae) volunteers as a genetic "bridge" to weedy sunflower populations in North America. *Am J Bot* 93: 127-133.
- Rieseberg L.H. 1991 Homoploid reticulate evolution in *Helianthus*: Evidence from ribosomal genes. *Am J Bot* 78: 1218-1237.
- Rieseberg L.H. 2000 Crossing relationships among ancient and experimental sunflower hybrid lineages. *Evolution* 54: 859–865.
- Rieseberg L.H. 2006 Hybrid speciation in wild sunflowers. *Ann Mo Bot.Gard* 93: 34–48.

- Rieseberg L.H., Seiler G.J. 1990 Molecular Evidence and the Origin and Development of the Domesticated Sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Econ Bot* 44: 79-91.
- Rieseberg L.H., Carney S.C. 1998 Tansley Review—Plant Hybridization. *New Phytol* 140: 598-624
- Rieseberg L.H., Brunsfeld S.J. 1992 Molecular evidence and plant introgression. *Plant Molecular systematic* (eds. D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle), Chapman and Hall, New York pp. 151–176
- Rieseberg L.H., Ellstrand N.C. 1993 What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit Rev Plant Sci* 12 (3): 213-241.
- Rieseberg L.H., Beckstrom-Sternberg S., Liston A., Arias D. 1991 Phylogenetic and systematic inferences from chloroplast DNA and isozyme variation in *Helianthus* sect. *Helianthus* *Syst Bot* 16: 50–76.
- Rieseberg, L.H., Desrochers A.M., Youn S.J. 1995a Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). *Am J Bot* 82: 515–519.
- Rieseberg L.H., Linder C., Seiler G. 1995b Chromosomal and genic barriers to introgression in *Helianthus*. *Genetics* 141: 1163-1171.
- Rieseberg L.H., Baird S.J.E., Desrochers A.M. 1998 Patterns of mating in wild sunflower hybrid zones. *Evolution* 52: 713–726.
- Rieseberg L.H., Archer M.A., Wayne R.K. 1999a Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83:363–372.
- Rieseberg L.H., Kim M.J., Seiler G.J. 1999b Introgression between the cultivated sunflower and a sympatric relative, *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Int. J Plant Sci* 160: 102-108.
- Rieseberg L.H., Whitton J., Gardner K. 1999c Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gen flow between two sunflower species. *Genetics* 152: 713-727.
- Rogers CH E, Thompson TE, Seiler GJ, 1982 Sunflower species of the United States, National Sunflower Association, Fargo ND, USA, 75 p.
- Rosenthal D.M., Rieseberg L.H. Donovan L.A. 2005 Re-creating ancient hybrid species' complex phenotypes from early-generation synthetic hybrids: three examples using wild sunflowers. *Am Nat* 166: 26–41.
- Schilling, E.E., Heiser C.B. 1981 An 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.

- Seefeldt S.S., Zemetra R., Young F.L., Jones S.S. 1998 Production of herbicide-resistant jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) X wheat (*Triticum aestivum*) hybrids in the field by natural hybridization. *Weed Sci* 46: 632-634.
- Seiler G.J. 1998 Seed maturity, storage time and temperature, and media treatment effects on germination of two wild sunflowers. *Agron J* 90: 221-226
- Seiler G.J., Rieseberg L.H. 1997 Systematics, origin and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower (21 –66). En: Schneiter A.A. (Ed.) *Sunflower Technology and Production*. Agronomy Series N°35. Am Soc Agronomy, Madison, Wisconsin, 834p.
- Shaner D.L., Anderson J.A., Stidham M.A. 1984 Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology* 76: 545-546.
- Snow A.A., Morán Palma P. 1997 Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks. *BioScience* 47: 86-96.
- Snow A.A., Morán 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.
- Snow A.A., Uthus K.L., Culley, T.M. 2001 Fitness of hybrids between weedy and cultivated radish: implications for weed evolution. *Ecol Appl* 11: 934–943.
- Snow A.A., Pilson D., Rieseberg L.H., Paulsen M.J., Pleskac N., Reagon M.R., Wolf D.E., Selbo S.M. 2003 A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications* 13: 279-286.
- Snow, A.A., Andow, D.A., Gepts, P., Hallerman, E.M., Power, A., Tiedje, J.M., Wolfenbarger, L.L. 2005 Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecol. Appl.* 15: 377–404.
- Soltis, D., Soltis, P. (Eds.). 1989 *Isozymes in Plant Biology*. Advances in Plant Sciences Series. Vol. 4. Portland, Oregon. 268 p.
- Soltis, D.E., Hafler, C.H., Darrow, D.C. and Gastony, G.J. 1983 Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am Fern J* 73: 9–27.
- Stewart C.N.Jr, Halfhill M.D. Warwick S.I. 2003 Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives *Nature Rev Genet*, 4: 806-817.
- Strasburg J., Rieseberg L. 2008 Molecular demographic history of the annual sunflowers *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*—large effective population sizes and rates of long-term gene flow. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 62: 1936–1950
- Sujatha M., Prabakaran A.J, Sangam Dwivedi L., Chandra S. 2008 Cytomorphological and molecular diversity in backcross-derived inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Genome* 51: 282–293.

- Swofford D.L., Selander R.B. 1981 "biosys-1: A fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population-genetics and systematics J Heredity 72: 281-283.
- Tan S.Y., Evans R.R., Dahmer M.L., Singh B.K., Shaner D.L. 2005 Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Management Science 61: 246–257.
- Torres A. 1974. Sunflower alcohol dehydrogenase: ADH, genetics and dissociation-recombination. Biochemical Genetics 11: 17-24.
- Torres E., Iriondo J.M., Pérez C. 2003 Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis, Am J Bot 90: 85–92.
- Tranel P., Wright T. 2002 Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? Weed Science 50: 700–712.
- Troiani H.O., Steibel P.E. 1999 Sinopsis de las Compuestas (Compositae Giseke) de la Provincia de La Pampa, República Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, 10, Serie Suplemento 1, Santa Rosa LP, 90 pp.
- Umbarger H.E. 1978 Amino acid biosynthesis and its regulation. Annu Rev Biochem 47: 533–606
- Ureta M.S., Carrera A.D., Cantamutto M.A., Poverene M.M. 2008 Gene flow among wild and cultivated sunflower, *Helianthus annuus* in Argentina. Agric Ecosyst Environ 123: 343–349
- Vacher C., Weis A.E., Hermann D., Kossler T., Young C., Hochberg M.E. 2004 Impact of ecological factors on the initial invasion of Bt transgenes into wild populations of birdseed rape (*Brassica rapa*) Theor Appl Genet 109: 806–814.
- Wendel J.F., Weeden N.F. 1989 Visualization and interpretation of plant isozymes. In *Isozymes in plant biology*, ed. D.E.Soltis and P.S. Soltis, 5-45. Portland: Dioscorides.
- White A.D., Owen M.D.K.; Hartzler R.G., Cardina J. 2002 Common Sunflower Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides. Weed Science 50: 432-437.
- Whitton J., Wolf D.E., Arias D.M, Snow A.A., Rieseberg L.H. 1997 The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. Theor Appl Genet 95: 33-40.
- Workman P.L., Niswander J.D. 1970 Populations studies on southwestern Indian tribes.II. Local genetic differentiation in the Papago. Am J Hum Genet 22: 24-49.
- Wright S. 1978 Variability within and among natural populations. En Evolution and the genetics of populations. Vol 4. University Chicago Press. Chicago.
- Yatabe Y., Kane N.C.,Scotti-Saintagne C., Rieseberg L.H. 2007 Rampant gene exchange across a strong reproductive barrier between the annual sunflowers, *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. Genetics 175: 1883–1893.

Zuloaga F.O, Morrone O.E. (Eds.) 1999 Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina. Monographs of Systematic Botany, Missouri Botanical Gardens.
<http://www.darwin.edu.ar/catalogo/indicevasculares.htm>

PRODUCCION CIENTIFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

Trabajos publicados

POVERENE M., CANTAMUTTO MA, CARRERA AD, URETA MS, SALAVERRY MT, ECHEVERRIA M, RODRÍGUEZ RH. 2002 El girasol silvestre (*Helianthus spp.*) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. RIA 31(2) INTA, Argentina.

POVERENE M, CARRERA A.,URETA S., CANTAMUTTO M. 2004. Wild *Helianthus* species and wild - sunflower hybridization in Argentina. *Helia*. ISSN 1018-1806. 27: 133-142.

POVERENE M, CARRERA A., CANTAMUTTO M. A., URETA S., DELUCCHI C., ALONSO ROLDAN V., BASUALDO J. *Helianthus petiolaris* in Argentina and spontaneous hybridization with cultivated sunflower. 16th. International Sunflower Conference, Fargo ND, USA, Vol. II: 741-746, 2004.

POVERENE M., CANTAMUTTO M.A., CARRERA A., URETA S., ALVAREZ D., ALONSO ROLDÁN V., PRESOTTO A., GUTIÉRREZ A., LUIS S., HERNÁNDEZ A. 2006. Wild sunflowers research in Argentina, *Helia* . ISSN 1018-1806. 29: 65-76.

URETA S., CARRERA A., CANTAMUTTO M. , POVERENE M. 2008. Gene flow between cultivated and wild sunflower *Helianthus annuus* in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* ISSN:0167-8800 – 123: 343–349

URETA S., CANTAMUTTO M. , CARRERA A., DELUCCHI C. , POVERENE M. Natural hybrids between cultivated and wild sunflowers in Argentina, *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 1267-1277, 2008.

CANTAMUTTO M., TORRES L., PRESOTTO A, GUTIÉRREZ A, URETA S., POVERENE M. 2009 "Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual *Helianthus* populations in central Argentina.", *Biol Invasions* DOI 10.1007/s10530-009-9458-8

Capítulos de libros

POVERENE M y URETA S. Evaluación de Impacto Ambiental. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, V Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski (Eds.) Parte X: Bioseguridad y Aspectos Legales, Capítulo II. ISBN 987-521-138-9. Ediciones del INTA, 2004.

POVERENE M, URETA S. y GUTIÉRREZ A. REEDICION de: Evaluación de Impacto Ambiental. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, V Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski (Eds.) Parte X: Bioseguridad y Aspectos Legales, Capítulo II. ISBN 987-521-138-9. Ediciones del INTA, 2008.

Trabajos presentados en congresos

URETA MS, DELUCCHI C, ALONSO ROLDAN V, CARRERA A, CANTAMUTTO M., POVERENE M. Flujo génico entre girasol cultivado y silvestre: Hibridación natural e introgresion. Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata, 17- 20 Septiembre de 2002.

URETA MS, KAMMERER V, CARRERA A, DELUCCHI C, POVERENE, M .Flujo génico entre girasol cultivado y silvestre: Variabilidad genetica en poblaciones naturales. Actas XXXI Congreso Argentino de Genética, La Plata, 17- 20 Septiembre de 2002.

CANTAMUTTO M, URETA S. CARRERA A. y POVERENE M. Indicios de hibridación entre especies anuales de *Helianthus* en la Argentina. 2º Congreso Argentino de Girasol ASAGIR 2003, Buenos Aires, 12-13 ago 2003.

URETA MS, CARRERA A, GARAYALDE A, NEGRIN V, RABINOVICH M, CANTAMUTTO M, POVERENE M. Tasa de hibridación entre girasol cultivado (*Helianthus annuus macrocarpus*) y girasol silvestre (*H.annuus annuus*). Actas XXXII Congreso Argentino de Genética, Córdoba, 21- 24 Septiembre de 2003.

POVERENE M, CANTAMUTTO M, SALABERRY T, ECHEVERRIA M, URETA S, DELUCCHI C, RODRIGUEZ R. Hibridación entre *Helianthus petiolaris* y girasol, *H. annus*, en condiciones naturales. Actas XXXII Congreso Argentino de Genética, Córdoba, 21- 24 Septiembre de 2003.

POVERENE M, CARRERA A, URETA S, CANTAMUTTO M. Wild Helianthus species and wild -sunflower hybridization in Argentina. Sunbio 2003 6th. European Conference on Sunflower Biotechnology. Seville, 5-9 October 2003. (España)

CANTAMUTTO M, CARRERA A, URETA S, POVERENE M. Germoplasma silvestre de girasol en la Argentina. Actas IV Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Mar del Plata, 10-14 nov. 2003, pp100.

URETA MS, CARRERA A, CANTAMUTTO MA, POVERNE MM. Evaluación de flujo génico entre girasol cultivado y silvestre mediante marcadores SSR. Actas XXXIII Congreso Argentino de Genética, p. 142. BAG Vol. XVI (Supplement) ISSN: BAG 1666-0390 26-29 sep. 2004.

POVERENE M. , CANTAMUTTO MA, CARRERA A, URETA S., ALONSO ROLDAN V., ALVAREZ D, PRESOTTO A., GUTIERRES A, BASUALDO J., HERNANDEZ L. 2000-2004

Activity Report on wild sunflowers research in Argentina. FAO Consultation Meeting, Novi Sad, Serbia and Montenegro, July 17–20, 2005.

RODRÍGUEZ, R.H., CASTAÑO, F.D., CLAUSEN, A., ECHEVERRÍA, M.M., SALABERRY, M.T., RIDAO, A., CÁCERES, C., POVERENE, M., CARRERA, A., CANTAMUTTO, M., URETA, S. Proyecto AGENCIA-ASAGIR 2003 PICTO 08: 13169: Conservación y evaluación de especies silvestres de girasol de importancia para el mejoramiento genético. 3º Congreso Argentino de Girasol ASAGIR 2005, Buenos Aires, 31/5-1/6/2005 www.asagir.org.ar

URETA MS, AD PRESOTTO, MA CANTAMUTTO, AD CARRERA, M POVERENE. Transferencia del carácter resistencia a imazapir desde girasol cultivado a las poblaciones silvestres de *H. annuus* spp. *annuus* Actas XXXV Congreso Argentino de Genética. p. 177. BAG Vol. XVII (Supplement II) ISSN: BAG 1666-0390. San Luis 24-27 sep. 2006

URETA MS, PRESOTTO, A, CANTAMUTTO, M, CARRERA, AD, POVERENE, M, Aptitud de plantas de girasol silvestre y de sus híbridos con girasol cultivado imi resistente. IV Congreso Argentino de Girasol – ASAGIR 28 y 29 Mayo de 2007.

CANTAMUTTO MA, MS URETA, A GUTIÉRREZ, AD PRESOTTO, MM POVERENE. Zonas híbridas entre especies silvestres de *Helianthus* en Argentina. XXXVI Congreso Argentino de Genética, p.192 BAG ISSN 1666-0390. Pergamino 23-26 sep. 2007.

URETA MS, AD PRESOTTO, A GUTIERREZ, AD CARRERA, M CANTAMUTTO, M POVERENE. Modificación del germoplasma silvestre de girasol en argentina por flujo génico desde el cultivo. Actas VI Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, México, 13-16 nov. 2007, pp. 49.

PRESOTTO AD, MS URETA, A CARRERA, M CANTAMUTTO, M POVERENE. Caracterización molecular de plantas tolerantes a imidazolinonas en cruces entre girasol cultivado y silvestre (*Helianthus annuus*) y cultivado. XXXVII Congreso Argentino de Genética, p.208 BAG ISSN 1666-0390. Tandil, 22-24 sep. 2008.

MONDÓN A, GUTIERREZ A, MIRANDA J, PRESOTTO A, URETA S, CANTAMUTTO M, POVERENE M. Confirmación de zonas híbridas entre especies silvestres de *Helianthus* mediante el estudio de progenies. XXXVII Congreso Argentino de Genética, p.208 BAG ISSN 1666-0390. Tandil, 22-24 sep. 2008.

MONDÓN A, GUTIERREZ A, PRESOTTO A, URETA S, CANTAMUTTO M, POVERENE M. Clasificación de híbridos naturales entre especies anuales del género *Helianthus* XXXVIII Congreso Argentino de Genética, p.125 Lilloa ISSN 0075-9481. Tucumán, 20-23 sept. 2009.

URETA S, PRESOTTO A, CANTAMUTTO M, POVERENE M Transferencia del carácter resistencia a imazapir (IMI) y modificación de la aptitud biológica de girasol silvestre. Actas

VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Chile, 28-30 oct. 2009, pp. 545-546.