

menores, lo que indica una menor aptitud biológica de los descendientes de híbridos interespecíficos.

Debido a la pronta recuperación en los parámetros de fertilidad observados en las generaciones posteriores a la hibridación con el cultivo, se puede afirmar que cualquier carácter que confiera una ventaja ecológica como resistencia a herbicidas, a enfermedades o insectos, tolerancia al frío o salinidad, difundirán rápidamente en la población silvestre, aunque los individuos F1 tengan una baja aptitud biológica. La resistencia a herbicidas del tipo imidazolinona característica de las variedades de girasol comercial Clearfield® puede ser transferida a *H. petiolaris* (Massinga *et al.*, 2005). Es por eso que la transferencia de rasgos con “riesgo ecológico” podría reducirse si se tienen en cuenta estrategias de control adecuadas.

CAPÍTULO IV: HÍBRIDOS DE GENERACIONES AVANZADAS

RELACIONES ECOLÓGICAS

INTRODUCCIÓN

La producción de girasol cultivado en nuestro país se ha visto frecuentemente influida por problemas sanitarios, que han afectado a los cultivos en forma directa como pérdida de producción, o en forma indirecta como retracción de la siembra por falta de seguridad de cosecha. Las principales causas de las pérdidas o inseguridades son enfermedades provocadas por hongos patógenos y la importancia relativa de las mismas varía anualmente según factores biológicos (grado de resistencia de los cultivares utilizados, razas prevalentes, presión de inóculo del patógeno) y ambientales (climáticos y de manejo) (Pereyra y Escande, 1994).

La roya negra es una enfermedad que afecta principalmente a las hojas. Su agente causal es el hongo *Puccinia helianthi*. Se caracteriza por la presencia de pústulas afelpadas de color herrumbre en el envés de la hoja que desprenden un polvillo del mismo color formado por las esporas diseminantes de la enfermedad. La roya blanca es una enfermedad que afecta principalmente a las hojas. Su agente causal es el hongo *Albugo tragopogonis*. Se caracteriza por la presencia de ampollas blancas en la cara superior de las hojas y pústulas eflorescentes blancas en la cara inferior. La verticilosis es una enfermedad que afecta a hojas y tallos. Su agente causal es el hongo *Verticillium dahliae*. Se caracteriza por la presencia de manchas amarillentas provocadas por la acción de toxinas del hongo, el centro de estas manchas se necrosa rápidamente. El oidio es una enfermedad que afecta principalmente a hojas y ocasionalmente tallos y brácteas. Su agente causal es el hongo *Erysiphe cichoracearum*. Se caracterizan por la presencia de un polvillo blanquecino en las partes aéreas de las plantas, principalmente en la parte superior de las hojas. La isoca medidora (*Rachiplusia nu*) es una plaga que afecta las hojas. Esta oruga es el estadio larval de una mariposa de hábito nocturno. La larva presenta la particularidad de tener solamente dos pares de patas y su forma de desplazamiento es el origen de su nombre vulgar. Se alimenta del parénquima de las hojas sin dañar las nervaduras (Pereyra y Escande, 1994).

Las especies silvestres de girasol tienen un papel significativo en la mejora genética de este cultivo oleaginoso, ellas poseen diferentes características de importancia económica que pueden ser transferidas a la forma cultivada mediante la hibridación interespecífica. *Helianthus petiolaris* constituye una valiosa fuente de variación genética para el mejoramiento del girasol cultivado y ha sido utilizada para la obtención de androesterilidad y resistencia a patógenos (Leclercq, 1969; Covas y Vargas López, 1970; Seiler y Rieseberg, 1997). Covas y Vargas Lopez (1970) compararon caracteres morfológicos y sanitarios entre *H. petiolaris*, girasol cultivado y híbridos interespecíficos entre ambas especies y demostraron que tanto las plantas silvestres como los híbridos aparecían libres de roya negra y blanca, pero eran atacados por isocas. Por lo tanto, era posible transferir mediante retrocruzamiento y selección caracteres de rusticidad propios de *H. petiolaris* al girasol cultivado, lo cual fue posteriormente comprobado (Jan y Seiler, 2007).

De la misma manera, sería posible la transferencia de caracteres novedosos del girasol domesticado a *H. petiolaris* mediante el flujo de polen. Estos caracteres comprenden tanto transgenes como mutaciones de origen natural, por ejemplo, resistencia a herbicidas (Al Khatib *et al.*, 1998; Massinga *et al.*, 2003; Kolkmann *et al.*, 2004).

Un riesgo ampliamente conocido de los cultivos transgénicos es que la hibridación con especies silvestres cercanas permita que transgenes relacionados con la aptitud biológica persistan en las mismas. Esto podría determinar que se vuelvan más abundantes en su hábitat natural o invadan nuevos hábitats. Además, poblaciones que contengan transgenes que afectan la herbivoría, la resistencia a herbicidas o patógenos podrían tener efectos en las poblaciones de microorganismos o insectos. Sin embargo, no se sabe si esos riesgos son justificados. Para determinar si un gen o transgen implica un riesgo para una especie silvestre o para las especies con las que ella interacciona, deberían contestarse tres preguntas sucesivas: sobre la existencia de barreras a la hibridación, sobre la diseminación del rasgo en la población silvestre y sobre sus consecuencias ecológicas (Snow *et al.*, 2000).

En los capítulos anteriores se ha demostrado, en primer lugar, que no hay barreras geográficas o genéticas completas para el escape de genes desde el cultivo de girasol hacia las poblaciones de *H. petiolaris*. En segundo lugar, que la aptitud biológica tiende a recuperarse luego de la hibridación, por lo que se espera que al menos ciertos genes incrementen su frecuencia en las poblaciones silvestres.

El presente capítulo trata de responder a la cuestión de cuáles serían las consecuencias ecológicas de la introgresión de genes de girasol doméstico en poblaciones de *H. petiolaris*. Para ello se compararon las respuestas de plantas silvestres puras y de descendientes de hibridación ante diversas adversidades frecuentes en el cultivo de girasol.

HIPÓTESIS ESPECÍFICA

Si existen diferencias en la resistencia genética al daño por microorganismos patógenos o insectos herbívoros entre la especie silvestre y la cultivada, también deberán encontrarse diferencias entre la especie silvestre y los híbridos silvestre x cultivado.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar niveles de daño entre ambos grupos de plantas, *H. petiolaris* y híbridos interespecíficos, frente a enfermedades fúngicas y al ataque de insectos y buscar asociaciones entre el nivel de daño y los caracteres que determinan aptitud biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo en el campo experimental del Departamento de Agronomía, dirigido a estudiar diferencias en los niveles de daño causado por el ataque natural de hongos e insectos. Comenzó por una evaluación ocular a fin de determinar los diferentes tipos de enfermedades que atacaban a las plantas durante ese año y se registraron las siguientes enfermedades y pestes presentes: Roya negra (*Puccinia helianthi*), roya blanca (*Albugo tragopogonis*), verticilosis (*Verticillium dahliae*), oidio (*Erisiphe* sp.) e isoca (*Rachiplusia nu*) (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Adversidades registradas en el campo experimental durante la campaña 2006-2007.



Roya negra
Puccinia helianthi



Roya blanca
Albugo tragopogonis



Verticilosis
Verticillium dahliae



Oidio
Erisiphe sp.



Isoca
Rachiplusia nu

Se evaluaron poblaciones de seis procedencias (0502, 0802-1, 0802-2, 0902, 1002 y 3202), cada una representada por 20 plantas de *H. petiolaris* y 20 descendientes de híbridos silvestre x cultivado de primera generación por polinización abierta. Cada una ocupaba una parcela con las 40 plantas distribuidas al azar y cada parcela estaba repetida tres veces. En total se analizaron 720 plantas; 360 correspondientes a *H. petiolaris* y 360 a los descendientes de híbridos. Se contó el número de plantas afectadas, se registró el nivel de daño en cada grupo y los datos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

Se encontraron diferencias altamente significativas entre *H. petiolaris* y los descendientes de híbridos para cuatro de las cinco enfermedades monitoreadas (Tabla 4.1). La población silvestre fue muy poco afectada por el ataque de insectos y hongos, mientras que entre los descendientes de híbridos se encontraron diferencias en el nivel de daño para las cinco adversidades evaluadas. La isoca fue responsable de los mayores ataques y daños a las plantas, mientras que la verticilosis fue la enfermedad menos frecuente.

Tabla 4.1 – Número de plantas de *H. petiolaris* (HP) y descendientes de híbridos de primera generación por polinización abierta (PA1) afectadas por el ataque de hongos e insectos. Las distintas letras indican diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Adversidades	HP (N=360)	PA1 (N=360)	H	p-valor	Sign.
Verticilosis	0 a	3 a	0,73	0,0745	NS
Roya negra	0 a	39 b	5,19	0,0017	**
Roya blanca	2 a	56 b	19,20	<0,0001	**
Oidio	0 a	100 b	15,89	<0,0001	**
Isoca	11 a	241 b	24,99	<0,0001	**

Entre los orígenes geográficos de las poblaciones silvestres no se hallaron diferencias significativas para el ataque de hongos e insectos. De igual modo sucedió para los descendientes de híbridos, excepto en el caso de la isoca, en el que se encontraron diferencias de ataque entre los distintos sitios. La población de la provincia de San Luis fue la más afectada, con 56 individuos atacados de un total de 60 muestreados. Le siguieron las poblaciones 0802 de la provincia de La Pampa con 103 sobre 120 plantas atacadas, sin diferenciarse de las otras dos localidades de la misma provincia, Catrilo con 32 afectados de 60 y Santa Rosa (0902) con 29 de 60. Finalmente la población 1002 se diferenció significativamente del resto, ya que tuvo 21 plantas afectadas de un total de 60 descendientes de híbridos analizados.

DISCUSIÓN

Hace más de 60 años que se utilizan poblaciones silvestres como fuente de recursos genéticos para incorporar caracteres de importancia agronómica a los cultivos. Un estudio realizado por Hajjar y Hodgkin (2007) reveló que en los últimos 20 años se utilizaron especies silvestres para el mejoramiento y los rasgos más relevantes tuvieron que ver con resistencia a plagas y enfermedades, estrés abiótico, calidad en la producción y andro-esterilidad. La resistencia a plagas y enfermedades tuvo la mayor importancia en cuanto al mejoramiento de cultivos ya que implicó el 80% de los rasgos beneficiosos.

Los mejoradores han explotado al germoplasma silvestre de girasol durante mucho tiempo y aún hoy lo continúan estudiando para sacar provecho comercial de esta importante fuente (Jan y Seiler, 2007). El rasgo más reciente que aportó el girasol silvestre *H. annuus* a los híbridos comerciales es la resistencia a los productos químicos imidazolinonas y sulfonilureas utilizados como herbicidas (Seiler y Gulya, 2004). Estos genes de resistencia se han transferido a híbridos cultivados bajo el nombre comercial "Clearfield". La esterilidad masculina citoplásmica (cytoplasmic male sterility, CMS) ha sido hallada en varias especies silvestres, dando por resultado una considerable investigación de híbridos. En el caso del girasol, la esterilidad masculina citoplásmica provino de la especie silvestre, *H. petiolaris*, donante del citoplasma androestéril utilizado en los híbridos comerciales de alto rendimiento. Actualmente se estima que, el 100% de la producción de girasol en EEUU y aproximadamente el 60 - 70% de la producción de todo el mundo es obtenida mediante estos híbridos.

Para conocer el efecto de la hibridación interespecífica e introgresión de genes del girasol domesticado en la especie silvestre es necesario saber si los genes alteran las relaciones ecológicas de la planta silvestre con su ambiente biótico y abiótico.

Un gen o transgen que aumenta su frecuencia en una población silvestre lo hace porque incrementa la supervivencia y la fecundidad y un riesgo discutido en la literatura es el efecto de ese incremento de la aptitud individual en el tamaño poblacional, la dinámica y el uso del hábitat de la especie silvestre. Además, los transgenes que confieren resistencia a patógenos o insectos tendrán efectos sobre las especies que utilizan esas plantas silvestres como huésped. Estas cuestiones son cruciales para determinar el impacto ambiental, pero virtualmente no se han realizado estudios sobre ellas.

Nuestros resultados mostraron que las plantas descendientes de los híbridos interespecíficos fueron significativamente más susceptibles a las plagas y enfermedades que *H. petiolaris*, probablemente debido a la gran variabilidad genética presente en el genoma silvestre y ausente en el cultivo. El flujo génico del girasol cultivado sobre *H. petiolaris* afectó las interacciones bióticas con sus predadores, demostrando que los genes del cultivo alteran las relaciones ecológicas en las poblaciones silvestres. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos estudios deberían replicarse en distintos ambientes y especialmente, bajo condiciones de estrés abiótico (Burke y Rieseberg, 2003).

Snow *et al.* (2003) demostraron que un transgen Bt incorporado a híbridos cultivo-silvestre de *H. annuus* incrementó la aptitud, demostrando menor daño por herbivoría y mayor fecundidad en distintos ambientes. Asimismo modificaría sus relaciones ecológicas con otros insectos no-blanco. En tanto, la incorporación de un transgen que confiere resistencia al hongo *Sclerotinia* no afectó la aptitud, aunque este estudio no evaluó relaciones ecológicas (Burke y Rieseberg, 2003).

Dos aspectos importantes de la incorporación de genes (o transgenes) del cultivo en las poblaciones silvestres son la relación costo/beneficio y los efectos involuntarios que pueden ir asociados, a veces debidos a efectos pleiotrópicos (Chapman y Burke, 2006). Los híbridos de colza (*Brassica napus*) con sus parientes silvestres tienen menor habilidad competitiva que *B. rapa* silvestre (Halfhill *et al.*, 2005) aunque en el caso del rábano silvestre los híbridos con el cultivo resultan mucho mejor adaptados (Gueritaine *et al.*, 2002).

La resistencia a pestes y enfermedades es todavía la razón principal por la que los mejoradores siguen estudiando a las especies silvestres. Son cada vez más el número de líneas de germoplasma con genes silvestres beneficiosos que se están poniendo a disposición de los sectores privados y públicos.

Sin duda en el caso de *H. petiolaris*, deberían planearse experimentos en diversos ambientes para revelar la forma en que un determinado gen del cultivo de girasol afecta la competencia de las poblaciones silvestres y si provoca paralelamente efectos diferentes de los esperados. Esta podría ser la dirección de futuros estudios de flujo génico entre variedades Clearfield y las especies silvestres de *Helianthus*.

CONCLUSIONES GENERALES

Los híbridos interespecíficos entre girasol, *Helianthus annuus* y *H. petiolaris* pudieron ser identificados mediante marcadores morfológicos y moleculares.

Los híbridos se diferenciaron de las especies parentales y mostraron morfología intermedia para la mayoría de los rasgos estudiados.

Los fragmentos RAPD amplificados de *H. annuus* constituyeron marcadores adecuados para detectar el flujo génico desde el cultivo hacia las poblaciones silvestres receptoras de genes con potencial impacto ambiental.

Las generaciones avanzadas de híbridos entre ambas especies resultaron intermedias cuando provinieron de polinización abierta y semejantes a *H. petiolaris* cuando fueron producto de retrocruzas con la población silvestre.

La identificación de individuos de origen híbrido en poblaciones silvestres se dificultaría a partir de la segunda generación luego de la hibridación, porque los rasgos morfológicos no fueron suficientes para detectar introgresión, al menos en los individuos resultantes de retrocruzas.

Sería necesario utilizar técnicas adicionales para revelar la introgresión, como el análisis de marcadores moleculares.

En parcelas experimentales con descendientes de cruzamientos controlados, así como en situaciones naturales, el análisis multivariado mostró un agrupamiento similar, confirmando la hibridación e introgresión entre *H. petiolaris* y el girasol domesticado.

Las descendencias de plantas atípicas halladas en condiciones naturales presentaron valores intermedios entre ambas especies parentales, altos coeficientes de variación y una elevada esterilidad, confirmando su origen híbrido.

La introgresión de genes de girasol cultivado en poblaciones silvestres disminuyó la aptitud biológica de los descendientes híbridos. Los descendientes de primera y segunda generación por polinización abierta tuvieron una aptitud menor que la especie silvestre, en tanto las retrocruzas tuvieron valores intermedios.

El parámetro de aptitud más afectado fue la fertilidad, posiblemente debido a las diferencias cromosómicas entre ambas especies parentales.

Se observaron diferencias entre las accesiones de distintos orígenes geográficos, sugiriendo un efecto importante del ambiente en la selección natural.

Todos los parámetros de aptitud se recuperaron en las generaciones posteriores a la hibridación, siendo la selección natural la causa principal de recuperación.

La introgresión de genes de girasol cultivado en las poblaciones silvestres originó plantas con un mayor porte vegetativo. Si bien la biomasa de los descendientes de

híbridos por polinización abierta superó significativamente a *H. petiolaris*, los parámetros de fertilidad fueron menores, lo que indica una menor aptitud biológica de los descendientes de híbridos interespecíficos.

Los descendientes de hibridación fueron significativamente más susceptibles a enfermedades y plagas que la especie silvestre pura.

El flujo génico del girasol cultivado sobre *H. petiolaris* afectó las interacciones bióticas con sus predadores, demostrando que los genes del cultivo alteran las relaciones ecológicas en las poblaciones silvestres.

Los resultados confirman la alta probabilidad de transferencia de caracteres del cultivo y la modificación de las poblaciones silvestres en el agroecosistema.

Los resultados obtenidos podrían aplicarse al estudio proactivo, caso por caso, de nuevas características del girasol provenientes de mutación natural o de eventos transgénicos, para establecer criterios de bioseguridad agropecuaria.

REFERENCIAS

- ADAM D (2003) Transgenic crop trial's gene flow turns weeds into wimps. *Nature* 421: 462.
- AHL GOY P, DUESING JH (1996) Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Biotechnology* 11: 39-40.
- AL KHATIB K, BAUMGARTNER JR, PETERSON DE, CURRIE RS (1998) Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Sci.* 46: 403-407.
- ALEXANDER MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.* 55:13-18.
- ALEXANDER HM, SCHRAG AM (2003) Role of soil seed banks and newly dispersed seeds in population dynamics of the annual sunflower, *Helianthus annuus*. *Journal of Ecology* 91: 987-998.
- ALEXANDER HM, CUMMINGS CL, KAHN L, SNOW AA (2001) Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *Am. J. Bot.* 88: 623-627.
- ANDERSON E (1948) Hybridization of the habitat. *Evolution* 2: 1-9.
- ANFINRUD MN (1997) Planting hybrid seed production and seed quality evaluation in sunflower technology and production. In: Schneiter AA (Ed.). *American Society of Agronomy, Madison, USA, 697-708.*
- ARIAS DM, RIESEBERG LH (1994) Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theor. Appl. Genet.* 89: 655-660.
- ARRIOLA PE, ELLSTRAND NC (1996) Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense* and crop sorghum, *S. bicolor*. *Am. J. Bot.* 83: 1153-1160.
- BARTON N, BENGTSSON BO (1986) The barrier to genetic exchange between hybridising populations. *Heredity* 57: 357-376.
- BARTON N, HEWITT GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113-148.
- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314 - 331.
- BRIGGS D, WALTER SM (1997) *Plant Variation and Evolution.* Cambridge University press. UK.
- BRUBAKER CL, WENDEL JF (1994) Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPS). *Am. J. Bot.* 81: 1309-1326.